

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA CLARA DUSZCZAK D'AGULHAM

ANÁLISE CITOLÓGICA E DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES EM
LÍNGUA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA DE FANCONI

CURITIBA

2011

ANNA CLARA DUSZCZAK D'AGULHAM

ANÁLISE CITOLÓGICA E DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES DA
LÍNGUA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA DE FANCONI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração: Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Ângela Naval Machado

CURITIBA

2011

D'Agulham, Anna Clara Duszczak

Análise citológica e das regiões organizadoras nucleolares em língua de crianças e adolescentes com Anemia de Falçoni / Anna Clara Duszczak D'Agulham – Curitiba, 2011.

80 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Maria Ângela Naval Machado
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2011.

Inclui bibliografia

1. Anemia de Fanconi. 2. Citologia. 3. Língua. 4. Carcinoma de Células Escamosas. 5. Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas.
I. Machado, Maria Ângela Naval. III. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.

CDD 617.63

TERMO DE APROVAÇÃO

ANNA CLARA DUSZCZAK D'AGULHAM

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

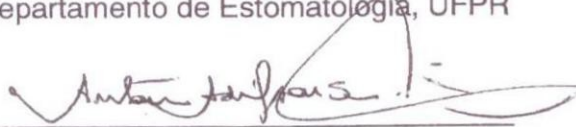
Análise citológica e das regiões organizadoras nucleolares da língua de crianças e adolescentes com anemia de Fanconi

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

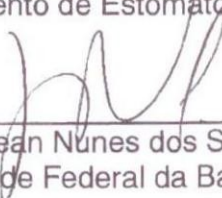
Orientador:



Prof. Dra. Maria Ângela Naval Machado
Departamento de Estomatologia, UFPR



Prof. Dr. Adilson Antonio Soares de Lima
Departamento de Estomatologia, UFPR



Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos
Universidade Federal da Bahia, UFBA

Curitiba, 15 de dezembro de 2011.

À Deus, minha FONTE DE FORÇAS. Obrigada por mais essa conquista e pelo poder do LIVRE ARBÍTRIO. Obrigada por SEMPRE ILUMINAR o meu caminho.

Aos meus pais, Eva e Miguel, pela dedicação incondicional durante todos os dias da minha vida. Obrigada por serem meu PORTO SEGURO e meu EXEMPLO. Meu AMOR por vocês é imenso e eterno, não tenho como agradecer por tudo. Sem vocês eu NADA SERIA! Amo vocês!

À minha avó, Marlene, SEMPRE PRESENTE, desde os meus primeiros passos. Uma amiga e conselheira. Obrigada por vibrar com as minhas vitórias e por ser o PILAR da nossa família. Amo você, Moma!

À minha irmã, Izabella, minha MELHOR AMIGA, por todas as coisas que vivemos juntas e que ainda iremos viver. Obrigada por SEMPRE estar ao meu lado em minhas batalhas, vitórias e derrotas. Você é meu ORGULHO. Amo você, Bili!

Ao meu amor, Márcio, meu AMIGO e COMPANHEIRO, que me faz sorrir, sonhar e viver os melhores dias da minha vida. Obrigada por SEMPRE estar ao meu lado e por sonhar os NOSSOS sonhos. Você é o AMOR da minha vida! Amo você!

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr^a. Maria Ângela Naval Machado, pelo incentivo incansável, pela presença constante e pela total entrega na realização desta pesquisa. Muito obrigada por todos os ensinamentos e pelas longas risadas.

Ao Professor Dr. Antonio Adilson Soares de Lima pela participação direta e indireta na realização deste estudo. Obrigada por todos os anos de ensinamentos e participação em minha vida profissional.

À Professora Dr^a. Ângela Fernandes e ao Professor Dr. José Miguel Amenabar Céspedes pelo tempo dedicado a leitura deste trabalho e correção para qualificação.

Ao Professor Dr. Fabian Calixto Fraiz pela oportunidade de integrar o grupo de Pós Graduação da Universidade Federal do Paraná.

Ao Professor Dr. José Zanis Neto pela oportunidade de ingressar no serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas do Paraná.

À Professora Dr^a. Carmem Bonfim pelo carinho e pela oportunidade. Obrigada por tornar possível a realização desta pesquisa e por sempre estar disponível para ajudar.

Ao Dr. Ricardo Pasquini Filho pela convivência agradável e pela gentileza em compreender o processo de coleta do estudo.

A toda a equipe de médicos, enfermeiros e funcionários do ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas do Paraná, por auxiliarem no andamento da pesquisa.

Ao Professor Dr. Cassius Carvalho Torres-Pereira pela oportunidade de ingressar no ambulatório de Transplante de Medula Óssea e pelos ensinamentos diários durante toda a pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação pela convivência e ensinamentos.

À Professora Maria Helena Martins Tommasi pelos ensinamentos, experiências de vida e convivência incrível nestes dois anos de estágio e docência.

Ao meu colega e amigo, Cassiano Lima Chaiben, pelo apoio incondicional e auxílio em todas as partes desta pesquisa. Desta etapa da minha vida levo muitos ensinamentos, mas com certeza, um grande amigo.

À minha colega e amiga Carolina Déa Bruzamolín por todos esses anos de amizade e companheirismo. Muito obrigada, por estar sempre ao meu lado quando eu mais preciso.

Aos meus colegas de turma. Muito obrigada pela amizade, pelas horas de aprendizado e de muita diversão.

Às mestrandas Karine Lyko e Larissa Cavalcanti de Albuquerque pelo auxílio e dedicação durante as coletas no ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas do Paraná.

À mestranda Milena Binhame Albini pelo auxílio durante o processamento laboratorial.

Ao Governo Federal, através do Programa de Apoio ao Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pelo auxílio financeiro durante o primeiro ano deste curso.

A todos os pacientes que fizeram parte deste estudo e seus responsáveis. Sem vocês, este estudo não teria sido possível. Muito obrigada pela convivência e pelos grandes ensinamentos de vida.

*Não sei se a vida é curta ou longa para nós,
mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.
Muitas vezes basta ser colo que acolhe, braço
que envolve, palavra que conforta, silêncio que
respeita, alegria que contagia, lágrima que
corre, olhar que acaricia, desejo que sacia,
amor que promove.
E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá
sentido à vida. É o que faz com que ela não
seja nem curta, nem longa demais, mas que
seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.
Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina.*

Cora Coralina

RESUMO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética autossômica recessiva rara, caracterizada por instabilidade cromossômica, pancitopenia e anomalias congênitas. A doença evolui para a insuficiência progressiva da medula óssea e para o desenvolvimento de neoplasias malignas, como a leucemia mielóide aguda e o carcinoma espinocelular (CEC) na região de cabeça e pescoço. O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é o único tratamento curativo para a insuficiência medular na AF. O risco de desenvolvimento de neoplasias malignas, principalmente o CEC, na cavidade bucal, aumenta consideravelmente após o TCTH. Os objetivos deste estudo foram avaliar as alterações morfológicas e morfométricas e quantificar as regiões organizadoras nucleolares em células epiteliais da língua em pacientes com AF, após o TCTH. Quarenta esfregaços da lateral da língua de 20 crianças e adolescentes com AF após TCTH (grupo caso) e de 20 crianças saudáveis (grupo controle) foram coletados por meio da citologia esfoliativa em base-líquida. Os grupos foram pareados por sexo e idade. Os esfregaços foram preparados e corados pela técnica de Papanicolaou (para análise morfológica e morfométrica) e impregnação pela prata (para quantificação de AgNORs). Após análise dos esfregaços, as variáveis morfológicas não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao predomínio celular e quanto a classificação de Papanicolaou para os grupos caso e controle. Com auxílio de um sistema analisador de imagens as variáveis área do núcleo (AN), área do citoplasma (AC) e relação área do núcleo-citoplasma (AN/AC) foram mensuradas. As variáveis AN ($71,85 \mu\text{m}^2$) e AC ($2127,48 \mu\text{m}^2$) estavam aumentadas no grupo caso em relação ao grupo controle ($55,21 \mu\text{m}^2$ e $1441,61 \mu\text{m}^2$, respectivamente). A média da relação AN/AC apresentou diminuição significativa no grupo caso (0,03) comparado ao grupo controle (0,04). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para a média de AgNORs por núcleo. Em conclusão, este estudo demonstrou alterações morfométricas, com aumento da AN e AC e diminuição da relação AN/AC, nas células epiteliais da língua de indivíduos com AF após o TCTH. Não foram observadas alterações na quantificação de AgNORs por núcleo em células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi. Citologia. Língua. Região Organizadora do Nucléolo. Carcinoma de Células Escamosas. Transplante de células-tronco hematopoiéticas.

ABSTRACT

Fanconi Anemia (FA) is a rare autosomal recessive genetic disease characterized by chromosomal instability, pancytopenia and congenital anomalies. The disease progresses to progressive bone marrow failure and the development of malignancies such as acute myeloid leukemia and squamous cell carcinoma (SCC) in the head and neck. The hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only curative treatment for bone marrow failure in FA. The risk of developing cancer, especially SCC in the oral cavity increases considerably after HSCT. The objectives of this study were to evaluate the morphological and morphometrical changes and quantify the nucleolar organizer regions in epithelial cells of the tongue in FA patients, after HSCT. Forty smears of the tongue side were collected by liquid-based exfoliative cytology in twenty FA children and adolescents after HSCT (case group) and 20 healthy children (control group), matched for age and gender. The smears were prepared and stained by the Papanicolaou technique (to evaluate morphological and morphometrical changes) and silver impregnation (to quantify AgNORs). To examination of smears, morphological variables showed no statistically significant difference regarding the prevalence and classification of Papanicolaou cell for case and control groups. With the aid of an image analyzing system variables area of the nucleus (NA), area of cytoplasm (CA) and area ratio of the nucleus-cytoplasm (NA/CA) were measured. Variables AN ($71,85 \mu\text{m}^2$) and AC ($2127,48 \mu\text{m}^2$) were increased in the case in the control group ($55,21 \mu\text{m}^2$ and $1441, 61 \mu\text{m}^2$, respectively). The mean ratio of NA/CA was significantly decreased in the case group (0.03) compared to control (0.04). No differences were found between the groups for the mean values of AgNORs per nucleus. In conclusion, this study demonstrated morphological changes, with increased AC and AN and decrease in the AN / AC, in the epithelial of the tongue of patients with AF after HSCT. No changes in the quantification of AgNORs per nucleus in epithelial cells of the tongue of patients with Fanconi anemia after transplantation of hematopoietic stem cells.

Key words: Fanconi Anemia. Cytology. Tongue. Nucleolus Organizer Region. Squamous Cell Carcinoma. Hematopoietic Stem Cell Transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- GENGIVITE EM CRIANÇA COM ANEMIA DE FANCONI APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS...	23
FIGURA 2	- ÚLCERA RECORRENTE EM INDIVÍDUO COM ANEMIA DE FANCONI.....	25
FIGURA 3	- KIT <i>DIGENE CERVICAL SAMPLER</i> ®	40
FIGURA 4	- COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DA LATERAL DA LÍNGUA COM ESCOVA CITOLÓGICA.....	41
FIGURA 5	- EQUIPAMENTO UTILIZADO NO PROCESSAMENTO LABORATORIAL.....	42
FIGURA 6	- HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS NO <i>VORTEX</i>	43
FIGURA 7	- SEQUÊNCIA DA PRENSAGEM DAS LÂMINAS.....	43
FIGURA 8	- FOTOMICROGRAFIA DE CÉLULAS EPITELIAIS DA LATERAL DA LÍNGUA.....	44
FIGURA 9	- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA SEQUÊNCIA PARA LEITURA DE LÂMINAS.....	46
FIGURA 10	- <i>LAYOUT</i> DO PROGRAMA ANALISADOR DE IMAGEM (<i>AnalySIS</i>).....	47
FIGURA 11	- FOTOMICROGRAFIA DAS CÉLULAS EPITELIAIS EXIBINDO AS AGNORS.....	48
QUADRO 1	- MEDICAMENTOS USADOS PELOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CASO E TEMPO DE TCTH.....	51
FIGURA 12	- FOTOMICROGRAFIA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DOS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	54
FIGURA 13	- FOTOMICROGRAFIA EXIBINDO AS AGNORS NO INTERIOR DO NÚCLEO DAS CÉLULAS EPITELIAIS.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	PREDOMINÂNCIA CELULAR NOS ESFREGAÇOS BUCAIS DO GRUPO CASO E NO GRUPO CONTROLE.....	51
TABELA 2	-	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFREGAÇOS BUCAIS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE PAPANICOLAOU NO GRUPO CASO E NO GRUPO CONTROLE.....	51
TABELA 3	-	MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DAS VARIÁVEIS AN, AC E AN/AC NO GRUPO CASO E NO GRUPO CONTROLE.....	52
TABELA 4	-	MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DA VARIÁVEL AGNORS POR NÚCLEO SEGUNDO OS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	Anemia aplásica
AC	-	Área do citoplasma
AF	-	Anemia de Fanconi
Ag	-	Símbolo do elemento químico prata
AgNORs	-	Regiões organizadoras nucleolares coradas pela prata
AN	-	Área do núcleo
AN/AC	-	Relação área do núcleo- citoplasma
CEC	-	Carcinoma espinocelular
DEB	-	Teste de Sensibilidade ao Diepoxibutano
DECH	-	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DP	-	Desvio padrão
HPV	-	Papilomavírus humano
LMA	-	Leucemia miélide aguda
NORs	-	Regiões organizadoras nucleolares
RNA	-	Ácido ribonucleico
SMD	-	Síndrome mielóidedisplásica
STM	-	<i>Specimen Transport Medium</i>
SPSS	-	<i>Statistical package for the Social Science</i>
TCTH	-	Transplante de células-tronco hematopoiética

LISTA DE SÍMBOLOS

μm^2	-	Micrômetro quadrado
\leq	-	Menor ou igual
$=$	-	Igual
\geq	-	Maior ou igual
®	-	Marca registrada
μL	-	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	-	Graus Célsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	ANEMIA DE FANCONI.....	17
2.2	MANIFESTAÇÕES SISTÊMICAS DA ANEMIA DE FANCONI.....	19
2.3	MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS DA ANEMIA DE FANCONI.....	21
2.4	MANIFESTAÇÕES BUCAIS DA ANEMIA DE FANCONI.....	22
2.5	TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA DA MEDULA ÓSSEA.....	25
2.6	TUMORES SÓLIDOS	27
2.7	CITOLOGIA ESFOLIATIVA	30
2.7.1	Citologia esfoliativa em base líquida.....	32
2.7.2	Características morfológicas e da coloração de células epiteliais	33
2.8	REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES	34
3	PROPOSIÇÃO	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	37
4.2	DELINEAMENTO DA PESQUISA	37
4.2.1	Linha de pesquisa... ..	37
4.3	AMOSTRA.....	37
4.4	VARIÁVEIS INTERVENIENTES.....	38
4.4.1	Critérios de inclusão.....	38
4.4.2	Critérios de exclusão.....	38
4.5	MÉTODOS	39
4.5.1	Coleta de dados.....	39
4.5.2	Processamento laboratorial	40
4.5.3	Análise morfológica.....	43
4.5.4	Análise morfométrica.....	44
4.5.5	Quantificação de AgNORs.....	46
4.5.6	Análise estatística.....	47

4.5.6.1	Análise morfológica.....	48
4.5.6.2	Análise morfométrica.....	48
4.5.6.3	Quantificação de AgNORs.....	48
5	RESULTADOS.....	49
5.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	51
5.2	ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	52
5.3	ANÁLISE DA QUANTIFICAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS	
	NUCLEOLARES (AgNORs).....	53
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICES.....	68
	ANEXOS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A Anemia de Fanconi (AF) é uma anemia aplásica (AA) hereditária autossômica recessiva associada a múltiplas alterações congênitas e instabilidade cromossômica. É caracterizada pela progressiva falência da medula óssea (pancitopenia) e pela predisposição ao desenvolvimento de neoplasias malignas, como a leucemia e os tumores sólidos (PASQUINI, 2000; ALTER, 2003; ROSENBERG *et al.*, 2005).

As manifestações clínicas da AF iniciam na primeira década de vida e incluem alterações na pigmentação da pele, malformações cardíacas e renais além de alterações esqueléticas, principalmente em membros superiores (BUTTURINI *et al.*, 1994; KUTLER *et al.*, 2003a).

A instabilidade cromossômica da AF é marcada por um reparo defeituoso do DNA somado à hipersensibilidade ao efeito indutor de quebras cromossômicas por agentes clastogênicos (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003; AUERBACH, 2009).

A falência da medula óssea, na AF, pode ser corrigida pelo transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Apesar da melhora no quadro hematológico, estes indivíduos apresentam um aumento na predisposição ao desenvolvimento de tumores sólidos, principalmente o carcinoma espinocelular (CEC) na região de cabeça e pescoço, fígado e trato genital. Na cavidade bucal, o sítio de preferência é a lateral de língua (LUSTIG *et al.*, 1995; PASQUINI *et al.*, 2003).

O diagnóstico precoce do CEC nestes indivíduos é fundamental e garante um melhor prognóstico. Indivíduos com AF apresentam de 700 a 800 vezes mais chances de desenvolver alterações malignas quando comparadas com a população em geral (ALTER *et al.*, 2005).

A citologia esfoliativa bucal surge como um instrumento útil no diagnóstico precoce e controle de lesões com potencial de malignização (FREITAS *et al.*, 2004; ACHA *et al.*, 2005; ALTER *et al.*, 2005).

Os estudos usando a citologia esfoliativa mostraram que as células do epitélio da mucosa bucal podem ser modificadas em alterações sistêmicas como na anemia, na diabetes e na síndrome da imunodeficiência adquirida (MONTÓ; RIZEK; FINE, 1961; JAJARM; MAHTASHAM; RANGIANI, 2008; POMPERMAYER *et al.*, 2011). Ainda podem ser modificadas em resposta a agentes locais como o álcool e o

tabaco (PAIVA et al., 2004; FONTES et al., 2008). Entretanto até o presente momento nenhum estudo utilizou a citologia esfoliativa para avaliar as alterações celulares (morfologia e morfometria) e a proliferação celular na mucosa bucal de doentes da AF após TCTH.

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são proteínas formadas por segmentos de DNA que contêm os genes para a produção de RNA ribossômico. Quando impregnadas pelos sais de prata são denominadas AgNORs e são visualizadas, através da microscopia de luz, como pontos negros no interior dos núcleos celulares durante a interfase (TRERÈ, 2000).

As AgNORs são marcadores da proliferação celular capazes de avaliar as modificações celulares e o comportamento biológico de lesões, estabelecendo o potencial de malignidade (PLOTON *et al.*, 1986; CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989; BUSTOS *et al.*, 2004).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os aspectos morfológicos, morfométricos de células esfoliadas na língua de doentes de Anemia da Fanconi que foram submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANEMIA DE FANCONI

A AF é uma doença autossômica recessiva rara e uma das AA mais frequentes. É caracterizada por instabilidade cromossômica, aparência fenotípica heterogênea e suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento de neoplasias malignas. A consanguinidade também é considerada um fator relevante (PASQUINI *et al.*, 2003; ALTER, 2003; KUTLER *et al.*, 2003a).

Essa doença foi descrita pela primeira vez pelo pediatra Guido Fanconi, em 1927, após estudo de uma família em que três crianças do sexo masculino, com idades entre cinco e sete anos, apresentavam pancitopenia e alterações congênitas. Baseado nessas observações e em outros critérios, Fanconi estabeleceu o diagnóstico, chamando-a de Anemia de Fanconi (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003).

A AF apresenta como principais características as malformações congênitas em diversos órgãos e a falência progressiva da medula óssea, que pode variar desde uma citopenia assintomática, em qualquer linhagem celular, até uma AA grave. Associado ao quadro hematológico, há também uma predisposição marcante à neoplasias, principalmente à leucemia mielóide aguda (LMA), a síndrome mielodisplásica (SMD) e a tumores sólidos (ALTER, 2003, *GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.56).

Os estudos sobre a frequência da AF no mundo são escassos. Estudos recentes demonstraram uma frequência média de 1:181 indivíduos com AF, nos Estados Unidos. A estimativa em 2010 foi de 550 à 975 indivíduos com AF vivendo nos Estados Unidos, e que por ano, 31 crianças nasceriam com AF no país (ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011). No Brasil, não existem estudos que demonstrem a prevalência ou frequência da AF.

A AF apresenta distribuição igualitária entre os sexos (NOWZARI *et al.*, 2001; KUTLER *et al.*, 2003a). No entanto, isto não é um consenso, pois alguns autores encontraram maior prevalência no sexo masculino (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003; ALTER *et al.*, 2005).

A idade média para o diagnóstico é de sete anos (ALTER *et al.*, 2005). A expectativa de vida é de 25 anos, podendo alcançar entre 30-40 anos de idade. Segundo Rosenberg, Greene e Alter (2003) aos 48 anos de idade, 93% dos indivíduos com AF foram submetidos ao TCTH (devido à falência da medula óssea ou leucemia mielóide aguda) ou desenvolveram um tumor sólido ou faleceram.

Cerca de um terço dos indivíduos com AF não manifestam malformações congênitas. Nestes, o diagnóstico geralmente é feito após o surgimento dos sintomas clínicos de disfunção hematológica, aumentando o risco de neoplasias malignas. Assim, a idade média do diagnóstico neste grupo é significativamente mais alta do que a de indivíduos com malformações. Isto se deve, muitas vezes, à falta de conhecimento do espectro fenotípico da AF (ALTER *et al.*, 2005; AUERBACH, 2009).

Além das características hematológicas e manifestações congênitas, a AF caracteriza-se pelo mau funcionamento do mecanismo de reparo do DNA. Entre as mais importantes estão a instabilidade cromossômica espontânea e a hipersensibilidade das células destes indivíduos ao efeito indutor de quebras cromossômicas por agentes clastogênicos, tais como a mitomicina C e o diepoxibutano (AUERBACH, 2009; D'ANDREA, 2010).

São reconhecidos 15 genes ou grupos de complementação específica responsáveis pela AF (A, B, C, D1 (BRCA2), D2, E, F, G, I, J, L, M, N, P e RAD51C). Estes representam mais de 95% dos casos de AF. As mutações em FA-A, C e FA-G são as mais comuns e representam cerca de 85% dos indivíduos doentes de AF em todo o mundo. Alguns indivíduos não apresentam mutações nestes 15 genes, por esse motivo, acredita-se na existência de novos genes relacionados a AF (ALTER; KUPFER, 2011).

A importância do conhecimento do tipo de mutação está na correlação existente entre o genótipo e o fenótipo. A gravidade do fenótipo é determinada pelo grupo de complementação específica e pelo tipo de mutação genética. Assim, características físicas severas, como a AA de início precoce é mais comum em indivíduos com mutações em genes específicos como FANCA, FANCCIVS4, FANCG e FANCI. A leucemia e os tumores sólidos ocorrem nos genes FANCD1/BRCA2 e FANCN/PALB2 (*GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.46).

Com base nestas características genéticas foram desenvolvidos métodos de indução de quebras cromossômicas, como o Teste de Sensibilidade ao Diepoxibutano (Teste do DEB). Este é o método clássico de referência usado para o diagnóstico da AF e é capaz de detectar rupturas ou aberrações cromossômicas nas células periféricas do sangue, após cultura de um mitógeno de células linfocitárias e agentes clastogênicos de DNA. O teste DEB, permite fazer um diagnóstico da AF em pessoas com sutis características clínicas, incluindo aquelas sem anomalias congênitas clinicamente detectáveis (GIAMPIETRO *et al.*, 1993; *GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.41).

As novas técnicas de diagnóstico concentram-se na determinação das correlações entre o genótipo e fenótipo e na terapia gênica, visando um melhor prognóstico e acompanhamento dos doentes de AF (*GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.236).

O diagnóstico precoce garante um controle hematológico da AF e o aconselhamento genético familiar. Este favorece a identificação pré-sintomática de irmãos afetados e auxilia na identificação de possíveis irmãos doadores de medula óssea, inclusive durante o período gestacional (SAGASETA *et al.*, 2003; REINHARD *et al.*, 2007).

2.2 MANIFESTAÇÕES SISTÊMICAS DA ANEMIA DE FANCONI

As manifestações sistêmicas em doentes de AF podem envolver desde malformações congênitas até padrões de normalidade. Diversos sistemas do corpo humano podem ser afetados como o sistema nervoso central, gastrointestinal, endócrino, esquelético, cardiorespiratório, dentre outros (GIAMPIETRO *et al.*, 1993; KUTLER *et al.*, 2003a).

Algumas manifestações clínicas são marcantes nos indivíduos doentes da AF, como a baixa estatura, microcefalia e microftalmia, anormalidades de pigmentação da pele (manchas café com leite) e malformações ósseas do osso rádio e anomalias do dedo polegar (REINHARD *et al.*, 2007; AUERBACH, 2009).

As anormalidades de pigmentação de pele são caracterizadas pela presença de manchas café com leite, podendo resultar em hiperpigmentação generalizada

com escurecimento de toda a pele, resultando em um aspecto "bronzeado" (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003; D'ANDREA, 2010).

Anormalidades esqueléticas em membros superiores podem envolver a ausência de dedos, polegares bífidos e hipoplasia ou ausência do osso rádio. Em membros inferiores é bem menos frequente podendo envolver displasia congênita do quadril, malformações vertebrais, escoliose, sindactilia ou alteração na implantação dos dedos dos pés (ROSENBERG; HUANG; ALTER, 2004).

Anomalias de crânio e face como microcefalia, microftalmia, estrabismo, raiz nasal larga, implantação anormal de cabelos ou retromicrognatia, também fazem parte das características clínicas da síndrome (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003).

A baixa estatura é a anomalia física mais frequente em indivíduos com AF e é muitas vezes secundária às deficiências hormonais, que incluem hipofunção hipofisária com hipogonadismo, deficiência do hormônio do crescimento, disfunção da tireóide e deficiência de insulina ou resistência com intolerância à glicose. A síndrome é geralmente associada a parâmetros de crescimento anormal tanto no pré-natal e pós-natal, com baixo peso ao nascimento. A baixa estatura é uma característica integrante da AF, porém a associação com endocrinopatias amplia as deficiências do crescimento em uma proporção significativa de indivíduos (ROSENBERG; HUANG; ALTER, 2004; AUERBACH, 2009).

Anormalidades de desenvolvimento gonadal e sexual podem envolver hipogonadismo. As mulheres podem apresentar aplasia de útero ou da vagina, atraso na menarca, ciclos menstruais irregulares e declínio da fertilidade. Os homens podem desenvolver criptorquidia (testículos ectópicos), hipospadia (mal formação congênita do meato urinário), diminuição da produção de espermatozóides e diminuição de sua fertilidade (AUERBACH, 2009).

Anomalias otológicas também são observadas nestes indivíduos, envolvendo ou não a perda auditiva. Dentre as anomalias são citadas pavilhão anormal ou ausente, orelhas proeminentes, orelhas com implantação baixa, canais de orelha pequena ou ausente, membrana timpânica ausente e ossículos fundidos (*GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.174).

Outras anormalidades que podem estar associadas a AF incluem alterações endócrinas como rins ectópicos, hipoplásicos, displásicos ou ausentes. Anomalias gastrointestinais podem envolver atresia de esôfago, duodeno e jejuno, além de

ânus perfurado e fístula traqueoesofágica. Além de diversas anomalias cardíacas de natureza estrutural e congênita (*GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.35; AUERBACH, 2009).

Devido à complexidade das anomalias congênitas nos doentes da AF, o tratamento destas é multidisciplinar incluindo ortopedia, cirurgia geral, endocrinologia, otorrinolaringologia dentre outros, viabilizando o acompanhamento e a melhora da qualidade de vida nesse grupo (*GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.9)

2.3 MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS DA ANEMIA DE FANCONI

A AF é a mais comum das AA na infância. Sabe-se que 90% dos doentes de AF desenvolvem a pancitopenia devido a AA, com manifestações na primeira década de vida, em média entre 8 à 10 anos de idade (ALTER, 1996; ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011).

Em indivíduos com AF, a AA é caracterizada por progressiva pancitopenia associada à hipocelularidade da medula óssea. A presença de hemorragias espontâneas, pela redução acentuada de plaquetas e de anemia devido a eritropenia é marcante em doentes de AF com aplasia medular. Além disso, devido a leucopenia, apresentam incapacidade de combater com sucesso as infecções (ALTER, 1996; PASQUINI, 2000; ROSENBERG; HUANG; ALTER, 2004).

Os doentes da AF podem desenvolver ao longo da vida neoplasias hematológicas, em decorrência da falência medular, como a síndrome mielodisplásica (SMD) e a leucemia mieloide aguda (LMA) (*GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.35).

A SMD refere-se a um grupo de doenças hematopoiéticas de origem clonal da medula óssea, caracterizada por produção, maturação e aparecimento de células sanguíneas que frequentemente culminam em deficiência de hemácias, leucócitos e plaquetas, levando à LMA. Esta não é considerada uma neoplasia, mas sim uma anormalidade hematológica precursora da LMA (ALTER *et al.*, 2005; *GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.53).

A LMA é a neoplasia maligna mais comum na AF e a idade média para o desenvolvimento é de 13 anos. Esta apresenta um risco de desenvolvimento 800 vezes maior quando comparado à população em geral. É uma enfermidade da medula óssea, caracterizada pelo crescimento descontrolado de leucócitos imaturos e reduzida quantidade de plaquetas (ALTER 2003; ROSENBERG; HUANG; ALTER, 2004).

A associação de insuficiência medular, alto risco de câncer e a síndrome da instabilidade cromossômica não é surpreendente, pois excessivas quebras cromossômicas podem causar danos no reparo do DNA, apoptoses e mutações que conferem uma vantagem seletiva para o crescimento de células progenitoras (MATHEW, 2006).

De modo geral, indivíduos que desenvolvem AA, LMA ou SMD em idade precoce devem ser investigados quanto à AF, mesmo sem manifestações clínicas da síndrome (ALTER 2003).

2.4 MANIFESTAÇÕES BUCAIS DA ANEMIA DE FANCONI

As alterações bucais em indivíduos com AF são muitas. No entanto, a doença periodontal, causada pelo acúmulo da placa dental, é a mais citada. O sangramento gengival e a hiperemia são achados marcantes em doentes de AF (FIGURA 1). A pobre higiene bucal é somada à condição sistêmica que se torna um agente agravante da gengivite e periodontite nesses indivíduos (NOWZARI *et al.*, 2001; TEKCICEK *et al.*, 2007).

A trombocitopenia e a anemia crônica são alterações hematológicas comuns em indivíduos com AF. A trombocitopenia exacerba o sangramento gengival e a anemia crônica pode favorecer a palidez da mucosa e da gengiva (AÇIKGÖZ *et al.*, 2005).

Araújo *et al.* (2007) consideraram que a condição hematológica não interfere na presença ou ausência da doença periodontal, mas sim a condição de higiene dos indivíduos com AF. Os autores não encontraram uma relação direta entre a contagem plaquetária, inflamação gengival e a saúde periodontal nos indivíduos com AF.



FIGURA 1 – GENGIVITE EM CRIANÇA COM ANEMIA DE FANCONI APÓS TRANSPLANTE DE CELULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS
FONTE: O AUTOR (2011)

A periodontite agressiva é comum em indivíduos jovens com AF. A perda horizontal acentuada do osso alveolar é resultante de precária higiene bucal, associada à deficiência leucocitária e a patogenicidade dos microorganismos da placa dental bacteriana. O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e o citomegalovírus humano são essenciais no estabelecimento da periodontite agressiva. Estes microorganismos associados à imunossupressão podem resultar em perdas dentárias (OPINYA; KAIMENYI; MEME, 1988; ENGEL; RUSKIN; HAROLD, 1992; NOWZARI et al., 2001).

Além da doença periodontal, a cárie também é uma infecção comum nos jovens e adolescentes com AF. A prevalência de cárie na AF é de 35%, não demonstrando alterações microbiológicas significativas, quando comparado à população em geral (AÇIKGÖZ et al., 2005; TEKCICEK et al., 2007).

Anomalias dentárias numéricas, de posição, dimensão e forma podem ser observadas nessa população. Dentre as anomalias numéricas, a agenesia e os dentes supranumerários são as mais comuns, sendo o incisivo lateral superior o mais afetado. Quanto à posição, a giroversão de dentes permanentes e a transposição dentária são as mais relatadas. O canino permanente apresenta maior prevalência da transposição dentária (ARAÚJO et al., 2007; TEKCICEK et al., 2007).

Dentre as anomalias de dimensão e forma destacam-se as raízes curvas, afiladas e com dilacerações apicais, as pérolas de esmalte, taurodontia, microdontia e hipoplasia de esmalte (ARAÚJO et al., 2007; TEKCICEK et al., 2007).

Koubik *et al.* (2006) relataram discrepância entre idade dental, cronológica e óssea em indivíduos com AF, sendo que a idade dental e óssea são inferiores à idade cronológica. A baixa estatura e déficit de hormônios do crescimento são comuns em AF, devido à hipoatividade do hipotálamo e hipotireoidismo (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003).

A hipossalivação também é umas das manifestações bucais da AF, tanto em indivíduos submetidos ao TCTH, quanto naqueles que não realizaram o transplante. A patogênese da AF associada ao uso constante de fármacos pode alterar o fluxo salivar (TEKCICEK *et al.*, 2007; MATTIOLI *et al.*, 2010).

As alterações de fluxo salivar podem acarretar aumento na prevalência de cárie e na predisposição ao desenvolvimento de infecções, porém não é um fator isolado. Alterações na composição salivar são relatadas, como nas baixas concentrações de uréia e cálcio justificadas pela atresia gastrointestinal e alterações renais e hepáticas (TEKCICEK *et al.*, 2007; MATTIOLI *et al.*, 2010).

Otan *et al.* (2004) relataram que dentre as alterações em tecidos moles, as úlceras aftosas recorrentes são as lesões bucais mais comuns nos pacientes com AF (FIGURA 2). Estas estão relacionadas com a condição hematológica, principalmente a neutropenia e a anemia, pois há uma melhora na cicatrização das úlceras recorrentes nas semanas posteriores às transfusões sanguíneas. Além disso, com a deficiência leucocitária, há uma redução da imunidade e maior facilidade no desenvolvimento dessas lesões ulceradas.

Na língua, as alterações mais comuns são a atrofia papilar, língua saburrosa, a macroglossia e a pigmentação melânica (OPINYA; KAIMENYI; MEME, 1988; TEKCICEK *et al.*, 2007).

Lesões e condições com potencial para malignização, como leucoplasias, eritroplasias e o líquen plano, bem como o próprio CEC devem ser consideradas importantes alterações na língua dos pacientes com AF, pois esse é o sítio de preferência de desenvolvimento dessas lesões, com prevalência de 69%. (LUSTIG *et al.*, 1995; KUTLER *et al.*, 2003b; WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007).



FIGURA 2 – ULCERA RECORRENTE EM INDIVÍDUO COM ANEMIA DE FANCONI
FONTE: O AUTOR (2011)

2.5 TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA DA MEDULA ÓSSEA

O tratamento da insuficiência medular em indivíduos com AF envolve tratamento hormonal com andrógenos, fatores de crescimento hematopoiéticos (citoquinas) e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (D'ANDREA, 2010).

Os andrógenos são utilizados para aumentar a concentração de hemoglobina, normalizando as hemácias e melhorando também a contagem de plaquetas. Este tratamento hormonal envolve baixo risco de mortalidade, porém apresenta diversos efeitos secundários, tais como a masculinização, hiperatividade, icterícia, adenoma hepático, hipertensão arterial, dentre outros. Além disso, não previne a progressão da LMA e a SMD (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003; *GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.183).

Os fatores de crescimento hematopoiéticos, conhecidos também como citocinas (GM-CSF e G-CSF), aumentam a quantidade de neutrófilos e, em alguns casos, há melhora na contagem de hemoglobina e plaquetas (*GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.60).

A prescrição de andrógenos e fatores de crescimento podem ser eficazes no tratamento da falência medular na AF. Mas a maioria dos pacientes tornam-se

refratários a estes tratamentos. Nesses casos, o TCTH é o tratamento de eleição. (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003; ALTER *et al.*, 2005).

O TCTH é o único tratamento curativo para a insuficiência medular e capaz de restaurar a hematopoiese normal na AF. Indivíduos submetidos ao TCTH apresentam sobrevida de 70% (SOCIÉ *et al.*, 1991; ALTER, 1996; PASQUINI *et al.*, 2003).

É um procedimento de infusão venosa de células retiradas da medula óssea, sangue periférico ou cordão umbilical, com a finalidade de restabelecer a hematopoiese e as funções imunológicas (ALBERTINI; RUIZ, 2004).

O TCTH pode ser realizado por um doador aparentado, chamado de transplante alogênico ou por um doador não aparentado. O TCTH alogênico é a melhor terapia disponível para a cura da AF, pela sua alta compatibilidade de genótipos e reduzida taxa de desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Em caso de ausência de um doador histocompatível na família, é indicado o TCTH por um doador não aparentado após avaliação criteriosa (SAGASETA de ILURDOZ *et al.*, 2003; *GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.197).

Devido à característica de instabilidade cromossômica e defeitos no reparo do DNA, inerente a AF, os indivíduos sofrem toxicidade extrema à quimioterapia e à radiação utilizadas nos regimes habituais de condicionamento para o TCTH (SOCIÉ *et al.*, 1998; ROSENBERG *et al.*, 2005).

Como resultado, o TCTH é seguido por um período de imunodeficiência reforçada por agentes imunossupressores, visando a profilaxia e a terapia da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (DEEG *et al.*, 1996).

A DECH caracteriza-se pelo ataque das células T do doador às células do receptor e é classificada de acordo com sua gravidade (Grau I ao IV). Esta alteração é bastante comum e é considerada uma das complicações pós TCTH. Pode manifestar-se de forma aguda nos 100 primeiros dias após o TCTH, ou crônica, após esse período. Diversos órgãos como a pele, olhos, fígado, sistema gastrointestinal e cavidade bucal são afetados (GUARDIOLA *et al.*, 2004; *GUIDELINES for Diagnosis and Management*, 2008, p.213).

Rosenberg *et al.* (2005) demonstraram forte relação entre a DECH e o CEC. Em seus estudos, indivíduos com AF que desenvolveram DECH severa após o

TCTH tiveram o risco aumentado em 33 vezes para o desenvolvimento de CEC. Esse resultado também foi relatado por Deeg *et al.* (1996) e Socié *et al.* (1998).

Segundo Pasquini *et al.* (2003) dois fatores são responsáveis pela predisposição de CEC associado à DECH crônica. A condição inflamatória crônica da doença e o infiltrado linfocitário presente, que induz a um aumento do potencial de mutações pela liberação de radicais oxigênio, bastante reativos.

Contudo, mesmo após o TCTH pode não haver a eliminação total do risco de neoplasia, pois algumas células residuais da AF podem persistir, mantendo o risco de uma transformação maligna (ALTER, 2003).

Apesar dos doentes da AF apresentarem uma predisposição inerente ao desenvolvimento de lesões malignas, o risco de desenvolvimento de tumores sólidos é aumentado naqueles submetidos ao TCTH. Isso se deve à associação existente entre o condicionamento pré TCTH, a imunossupressão pós TCTH, a insuficiência da medula óssea e a persistência à instabilidade cromossômica inerentes a AF (DEEG *et al.*, 1996; KUTLER *et al.*, 2003b; SALUM *et al.*, 2006).

A relação existente entre TCTH e tumores sólidos em indivíduos com AF é bem determinada na literatura. Entretanto, o regime modificado de condicionamento para TCTH para esses pacientes mostrou bons resultados e no geral, 44% dos transplantados sobrevivem livres de CEC por uma década ou mais (SOCIÉ *et al.*, 1991; JANSISYANONT; PAZOKI; ORD, 2000; ROSENBERG *et al.*, 2005).

2.6 TUMORES SÓLIDOS

Além da alta frequência de LMA em pacientes com AF, a alta incidência de malignidade não-hematológica é significativa. Indivíduos doentes de AF têm 700 vezes mais chance de desenvolver um tumor sólido do que indivíduos sem a doença. A região de cabeça e pescoço e o trato ginecológico são as áreas mais acometidas (ALTER *et al.*, 2005).

Segundo Alter (2003), 25% dos doentes da AF que apresentam alterações malignas só descobrem a síndrome após o diagnóstico da neoplasia ou das complicações decorrentes dessa.

Com a melhora na disponibilidade dos transplantes hematopoiéticos, em decorrência do maior número de doadores e dos novos protocolos, a taxa de sobrevivência de indivíduos com AF aumentou. Contudo, os doentes da AF chegam a idades mais avançadas, em que a incidência de tumores sólidos aumenta consideravelmente (AUERBACH, 2009). Pasquini *et al.* (2003) observaram que com o TCTH há uma redução acentuada no risco de neoplasia linfóides, porém há um aumento progressivo no risco de desenvolvimento de tumores sólidos.

O tumor sólido que mais acomete os indivíduos com AF é o CEC. Os sítios mais comuns são a região de cabeça e pescoço, a região anal, vulva e esôfago (SOARES *et al.*, 2004; ALTER *et al.*, 2005).

O CEC na região de cabeça e pescoço pode ser encontrado em qualquer revestimento mucoso do trato aéreo-digestivo superior, com início na cavidade bucal e nasofaringe, estendendo-se até a orofaringe, laringe ou hipofaringe (LUSTIG *et al.*, 1995; KUTLER *et al.*, 2003a; ASLAN, 2006).

Dentre os sítios do CEC, a cavidade bucal é a de maior predomínio (ALTER *et al.*, 2005). De acordo com *Guidelines for Diagnosis and Management* (2008, p.252), 65% dos CEC estão localizados na cavidade bucal. As regiões mais afetadas são a língua, o rebordo alveolar, a região retromolar, o assoalho e a mucosa bucal respectivamente (KUTLER *et al.*, 2003b). A incidência de CEC de língua na AF é de 69%, e a lateral de língua é a região de maior ocorrência, principalmente em crianças (LUSTIG *et al.*, 1995). Na população em geral, a proporção de CEC de língua é de 10 a 20% (KUTLER *et al.*, 2003b).

O comportamento biológico do CEC associado a AF é agressivo, com envolvimento de metástases linfonodais precoces e invasão dos tecidos moles, além de manifestar precocemente em relação à população geral (KUTLER *et al.*, 2003b; ASLAN, 2006).

A média de idade do diagnóstico de CEC na região de cabeça e pescoço na AF é de 26 anos e diminui para 21 anos naqueles pacientes submetidos ao TCTH, com variação de 11 a 33 anos. O tempo médio entre o TCTH e o diagnóstico do tumor sólido de cabeça e pescoço é de 3 à 15 anos. Aos 48 anos de idade, o risco cumulativo de um doente de AF desenvolver um tumor sólido é de 78% (ALTER, 2003).

Vários são os relatos de casos na literatura de crianças doentes de AF com CEC na região bucal, na idade de 5 a 14 anos (JANSISYANONT; PAZOKI; ORD,

2000; PASQUINI *et al.*, 2003; SALUM *et al.*, 2006; REINHARD *et al.*, 2007) e em adultos jovens até 20 anos (JACOBS; KARABUS, 1984; MILLEN *et al.*, 1997).

A observação mais significativa em doentes de AF que apresentaram CEC é a sua relação com o TCTH. Indivíduos submetidos ao TCTH desenvolveram CEC de maneira mais precoce que indivíduos também com AF, porém que não realizaram o TCTH (ALTER, 2003; ROSENBERG; GREENE; ALTER, 2003; GUARDIOLA *et al.*, 2004).

A razão do aumento na predisposição ao CEC pós TCTH está relacionada a diversos fatores. Primeiramente, a fatores inerentes à AF, tais como a instabilidade cromossômica e a predisposição a neoplasias malignas. Fatores relacionados ao condicionamento pré e pós-TCTH, que envolve irradiação corporal total e tratamento imunossupressor prolongado também acentuam esta predisposição (LUSTING *et al.*, 1995; DEEG *et al.*, 1996; MILLEN *et al.*, 1997; GUARDIOLA *et al.*, 2004).

Outros fatores de risco estão envolvidos no pós TCTH, dentre eles a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Rosenberg *et al.* (2005) relataram que 96% dos doentes de AF que desenvolveram DECH crônica morreram ou desenvolveram a neoplasia maligna, em média, seis anos após TCTH.

Fatores hormonais podem estar associados à patogênese do CEC. O predomínio de tumores sólidos no sexo feminino é maior (2:1) em relação às demais alterações neoplásicas desenvolvidas na síndrome (PASQUINI *et al.*, 2003; ALTER, 2005).

A predileção do CEC pela cavidade bucal, bem como pela região anogenital está relacionada a fatores predisponentes, tais como vírus pois as mucosas são uma via comum para infecções virais oncogênicas, especialmente o papilomavírus humano (HPV) e o herpes (KUTLER *et al.*, 2003b; ARAÚJO *et al.*, 2011). Além disso, a incorporação do genoma viral ao DNA das células de indivíduos com AF pode ser facilitada pela imunossupressão, decorrente da falência da medula óssea (KUTLER *et al.*, 2003b). Alter *et al.* (2005) sugeriram que 25% dos casos de carcinoma de cabeça e pescoço em indivíduos com AF está associado ao HPV.

Kutler *et al.* (2003b) relataram que a carcinogênese induzida pelo HPV em indivíduos com AF está associada com a inativação de p53 pelo HPV, e não por mutagênese direta.

O vírus símio 40, membro do grupo dos papovavírus inclui o HPV, este age na mucosa induzindo a carcinogênese viral (LUSTIG *et al.*, 1995; PASQUINI *et al.*, 2003).

O tratamento do CEC na cavidade bucal é realizado pela remoção cirúrgica radical da lesão. O diagnóstico precoce associado à excisão cirúrgica total parece ser o fator prognóstico mais importante em pacientes com AF e CEC. O acompanhamento constante no rastreamento das lesões com potencial para malignização e neoplasias devem ser feitos regularmente em indivíduos jovens com AF (REINHARD *et al.*, 2007).

O monitoramento deve ser anual em todo indivíduo doente da AF acima de 10 anos de idade, ou em qualquer idade após o TCTH. Além disso, a vacinação contra o HPV reduz o risco de CEC na região de cabeça e pescoço, bem como na região anogenital, portanto as imunizações devem estar em dia (LUSTIG *et al.*, 1995; ALTER *et al.*, 2005).

Qualquer indivíduo que desenvolve CEC na região de cabeça e pescoço, sistema gastrointestinal ou ginecológico em uma idade precoce e sem histórico de uso de tabaco ou álcool, deve realizar os exames para o diagnóstico da AF (ASLAN, 2006; ROSENBERG; TAMARY; ALTER, 2011).

2.7 CITOLOGIA ESFOLIATIVA

A citologia esfoliativa bucal é definida como o estudo e interpretação das células epiteliais descamadas da mucosa bucal. Caracteriza-se pela avaliação da morfologia celular microscópica após a fixação e a coloração. As células epiteliais são obtidas por raspagem com espátulas ou escovas, ou ainda bochechos com soluções ou amostras de saliva (FREITAS *et al.*, 2004; PÉREZ-SAYÁNSM *et al.*, 2010).

Esta técnica é um método simples, indolor, não invasivo e por esse motivo bem aceito pelos pacientes, diferente da biópsia, que é invasiva. É uma ferramenta de baixo custo e um importante exame complementar na detecção precoce de CEC (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002; FREITAS *et al.*, 2004; NAVONE; PENTENERO; GANDOLFO, 2011).

A detecção de indivíduos de alto risco para o desenvolvimento de lesões com potencial de malignização, bem como a intervenção em fases iniciais do CEC são responsáveis pela redução da mortalidade e morbidade nos doentes da AF (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002; FREITAS *et al.*, 2004).

O exame da citologia esfoliativa é amplamente usado na ginecologia, conhecido como exame de Papanicolaou. Este é um recurso eficaz na redução da incidência e mortalidade do carcinoma do colo do útero e no diagnóstico de lesões com potencial para malignização. Na odontologia vem sendo utilizada desde a década de 80 associada ao exame clínico como coadjuvante importante na detecção precoce do CEC (NAVONE; PENTENERO; GANDOLFO, 2011).

A citologia esfoliativa pode ser utilizada também em mucosa bucal saudável de indivíduos de alto risco ao desenvolvimento de neoplasias e no rastreamento de lesões com diagnóstico concluído de CEC (IGRAM *et al.*, 1963; ; FREITAS *et al.*, 2004; KUJAN *et al.*, 2006; PÉREZ-SAYÁNSM *et al.*, 2010).

A desvantagem da citologia esfoliativa é a sua baixa sensibilidade devido ao elevado número de resultados falsos negativos, devido à coleta inadequada das amostras, erro no processamento laboratorial e na interpretação subjetiva dos resultados. Isto pode ser minimizado pela associação com outras metodologias, tais como a morfometria ou outros métodos como análise molecular, detecção de marcadores tumorais e análise imunohistoquímicas de DNA (FREITAS *et al.*, 2004; KUJAN *et al.*, 2006).

A citomorfometria é capaz de revelar células atípicas com aumento da área nuclear, diminuição da área citoplasmática e estabelecer a relação área do núcleo e da área do citoplasma. Estas análises aumentam a sensibilidade da citologia esfoliativa no diagnóstico precoce do câncer bucal, tornando esta técnica objetiva, precisa e reprodutível. Além de possibilitar o diagnóstico de alterações celulares antes mesmo da manifestação clínica perceptível da lesão. Porém, não substitui a biópsia, pois não define o tipo de lesão maligna e nem a sua extensão (OGDEN; COWPE; WIGHT, 1997).

Cowpe, Longmore e Green (1988) e Ramaesh *et al.* (1998) utilizaram técnicas morfométricas para determinar os diâmetros do núcleo e do citoplasma em células da mucosa bucal normal, em lesões displásicas e no CEC. Observaram uma diminuição do diâmetro do citoplasma em lesões com displasia e no CEC, quando comparado o diâmetro de células da mucosa normal, sendo que o menor diâmetro

citoplasmático encontrado foi nas lesões de CEC. O oposto ocorreu nos diâmetros nucleares, pois esses maiores no CEC, seguido pelas lesões displásicas, sendo que o menor núcleo foi observado nas células da mucosa normal. Sendo estes autores, a redução na área do citoplasma associado ao aumento da área do núcleo, está relacionada à características de malignidade..

2.7.1 Citologia esfoliativa em base líquida

A citologia esfoliativa em base líquida é uma alternativa à citologia convencional, empregada até 1990. Apresenta resultados promissores na qualidade da amostra, com menos artefatos e quantidade superior de células para análise (NAVONE; PENTENERO; GANDOLFO, 2011).

Na citologia esfoliativa em base líquida, as células são armazenadas em frasco com solução fixadora para evitar ressecamento das mesmas. Essa solução produz uma suspensão de células que posteriormente são depositadas sobre lâminas de vidro, produzindo uma camada fina, homogênea e com abundante número de células. Pus, sangue ou muco estão diminuídos em relação à técnica convencional da citologia e o fundo claro melhora a sensibilidade e a especificidade da técnica. A diminuição de artefatos nas lâminas é explicada pelo uso da membrana de policarbonato durante o processamento laboratorial. Essas apresentam porosidade padronizada que retém as células epiteliais e permite a passagem de outras partículas (PÉREZ-SAYÁNSM *et al.*, 2010; CAMPAGNOLI *et al.*, 2011).

O uso de escova permite um aumento no número de células coletadas por amostra do epitélio escamoso estratificado ceratinizado ou não da mucosa bucal, além de permitir a penetração das cerdas nas camadas mais subsuperficiais, recolhendo também algumas células basais, tornando a amostra mais representativa (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002; PÉREZ-SAYÁNSM *et al.*, 2010).

A citologia em base líquida apresenta melhores resultados quanto à espessura do esfregaço (41%) e na distribuição das células (66%) (HAYAMA *et al.*, 2005). Além de melhora na morfologia celular e na sobreposição celular quando comparada com a técnica da citologia esfoliativa convencional. Uma redução de

54,6% é observada no número de esfregaços insatisfatórios na citologia esfoliativa em base líquida quando comparada à convencional. Assim, a citologia esfoliativa em base líquida permite maior detecção de características de malignidade (CAMPAGNOLI *et al.*, 2011).

A citologia esfoliativa em base líquida apresenta melhor sensibilidade e especificidade 95,1 e 99,0% respectivamente, que a citologia convencional 85,7 e 95,9% (NAVONE *et al.*, 2007).

Em estudos sobre a avaliação de lesões com potencial para malignização, comparando a citologia esfoliativa convencional e em base líquida observou-se que embora a citologia convencional seja útil no diagnóstico, a citologia em base líquida forneceu melhores resultados e maior quantidade de material (NAVONE *et al.*, 2007).

Kelles *et al.* (2011) sugeriram que utilizando a técnica de citologia esfoliativa e morfometria foi possível demonstrar transformação maligna na cavidade bucal de pacientes após o transplante renal, sendo um bom método de acompanhamento e monitoramento de lesões.

A associação da citologia esfoliativa em base líquida e a utilização de marcadores da atividade celular e nuclear (AgNORs), aumenta a possibilidade de diagnóstico de lesões suspeitas, principalmente em grupos de alto risco ao desenvolvimento de neoplasias malignas (REMMERBACH *et al.*, 2003).

2.7.2 Características morfológicas e da coloração de células epiteliais

As células do epitélio escamoso estratificado ceratinizado da mucosa bucal nos esfregaços estão organizados em camadas que podem ser diferenciadas pela sua morfologia e classificadas pela técnica de coloração de Papanicolaou (FREITAS *et al.*, 2004).

A coloração de Papanicolaou permite observar diferenças nas células epiteliais devido à afinidade dos corantes pelos constituintes citoplasmáticos. As células da camada basal são esféricas ou ovoídes, com citoplasma de cor verde ou azul esverdeado; o núcleo está em tom de azul, centralizado, redondo e aumentado em relação ao tamanho da célula. Na camada intermediária, as células aparecem

menores e alongadas, com seu citoplasma mais transparente e o núcleo menor e picnótico. A camada superficial apresenta células com citoplasma com grande quantidade de grânulos de queratohialina e as células da camada córnea são anucleadas e visualizadas em tons de vermelho, laranja, amarelo ou marrom (MONTGOMERY, 1951; SILVERMAN; BECKS; FARBER, 1958).

Algumas alterações na morfologia celular são indícios de malignidade quando presentes em diversas células do esfregaço. Na região nuclear, alterações como hiperchromatismo, figuras aberrantes de mitose, aumento exagerado do núcleo, anormalidades de distribuição na cromatina, multinucleação e anisocariose, são sugestivas de malignidade (MONTGOMERY; VON HAAM, 1951; SILVERMAN; BECKS; FARBER, 1958; COWPE; LONGMORE; GREEN, 1988; RAMAESH *et al.*, 1998).

No citoplasma, alterações como vacuolização, inclusão de corpos estranhos, anisocitose, propriedades alteradas dos corantes e o polimorfismo são indícios de malignidade (MONTGOMERY; VON HAAM, 1951).

2.8 REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são um grupo de proteínas nucleolares argirofílicas, que estão associadas com os centros fibrilares e fibrilas densas do núcleo da célula durante a interfase e são responsáveis pela replicação de RNA. Assim, quanto maior o número de NORs, maior a taxa de replicação dos ribossomos e células. As NORs ficam localizadas nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (TRERÈ, 2000; DERENZINI, 2000).

A técnica da impregnação por prata consiste na pigmentação seletiva das NORs por sais de prata, que podem ser observadas ao microscópio de luz como pontos negros no interior dos núcleos celulares, durante a interfase (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989; TRERÈ, 2000).

A quantificação de AgNORs foi desenvolvida inicialmente para análise do tamanho, forma e número dos componentes nucleolares, por meio de microscopia de luz. Devido as evidências relacionando a quantidade de AgNORs e o tempo de

duplicação celular, este método passou a ser confiável para avaliar a proliferação celular (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989).

A partir da segunda metade dos anos 80, foi demonstrado que células de lesões malignas frequentemente apresentam uma maior quantidade de AgNORs, em comparação com as correspondentes benignas ou células normais (PLOTON *et al.*, 1986; DERENZINI, 2000).

A contagem de NORs é um método que consiste na enumeração de cada ponto enegrecido no núcleo celular diretamente no próprio microscópio de luz. Se uma agregação de um ponto enegrecido não pode ser definido como NORs individual, então cada agrupamento é contado como uma proteína AgNOR (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989; TRERÈ, 2000).

O número, o tamanho e o arranjo de AgNORs apresentam correlação com os indicadores de atividade de proliferação celular. Assim, o número de sítios de AgNORs aumenta, com a diminuição da diferenciação celular. A quantificação de AgNORs em CEC (YUE; IWAI; FURUTA, 1999; CANO *et al.*, 2002;), tumores de glândulas salivares (ADEYEMI *et al.*, 2006) e epitélios displásicos (HILDEBRAND *et al.*, 2010) são maiores do que em mucosa normal, demonstrando a relação existente entre a proliferação celular, a malignidade e as AgNORs.

Uma das características mais importantes das transformações neoplásicas é o descontrole do ciclo celular, por esse motivo a avaliação da proliferação celular é considerada uma ferramenta valiosa para prever o comportamento neoplásico (CECARELLI, 2000).

A histomarcagem tem sido utilizada para a quantificação da proliferação celular em diferentes tecidos e lesões. É um método de mensuração da proliferação celular e do diagnóstico precoce do câncer bucal, sendo considerado um marcador da atividade celular e nuclear (PLOTON *et al.*, 1986; FONTES *et al.*, 2008; DERENZINI, 2000).

Os marcadores de proliferação celular, como o AgNOR, vêm sendo utilizados para um melhor entendimento biológico das várias alterações patológicas, em especial quando não há sinal clínico de lesão. Assim, pode-se monitorar lesões com propensão à malignidade ou áreas com alto risco ao desenvolvimento de lesões malignas (BUSTOS *et al.*, 2004; CANÇADO; YURGEL; FILHO, 2008; FONTES *et al.*, 2008).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O propósito deste estudo foi avaliar as variações morfológicas, morfométricas e as diferenças na proliferação das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi, após o transplante de células-tronco hematopoiéticas, utilizando a citologia esfoliativa em base líquida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a área do núcleo das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- Avaliar a área do citoplasma das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- Avaliar a relação da área do núcleo e do citoplasma das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- Quantificar as AgNORs das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o transplante de células-tronco hematopoiéticas.

4. METODOLOGIA

4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi iniciado após o protocolo de pesquisa ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas do Paraná e está sob o registro de número 2344238/2010-10 (ANEXO 1).

4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O desenho do estudo foi do tipo caso-controle com amostra pareada por sexo e idade.

4.2.1 Linha de Pesquisa

O trabalho está inserido na linha de pesquisa “Diagnóstico e tratamento das alterações bucais” do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná com área de concentração em “Saúde bucal durante a infância e a adolescência”.

4.3 AMOSTRA

Participaram do estudo 40 crianças e adolescentes com idade entre 7 a 18 anos, que foram divididas em dois grupos, pareados por sexo e idade:

- Grupo caso: 20 indivíduos com diagnóstico confirmado da Anemia de Fanconi e que realizaram o TCTH, provenientes do

ambulatório de transplante de medula óssea do Hospital de Clínicas do Paraná.

- Grupo controle: 20 indivíduos saudáveis, atendidos na clínica odontológica da Universidade Federal do Paraná.

4.4 VARIÁVEIS INTERVENIENTES

4.4.1 Critérios de Inclusão

No Grupo Caso foram incluídos no estudo:

- Indivíduos com diagnóstico confirmado de Anemia de Fanconi;
- Doentes da Anemia de Fanconi que realizaram o TCTH com tempo superior a seis meses;
- Ausência de manifestações estomatológicas, exceto a atrofia papilar.

No Grupo controle foram incluídos no estudo:

- Indivíduos saudáveis e com ausência de manifestações estomatológicas.

Em ambos os grupos foram incluídos no estudo:

- Indivíduos não tabagistas, não etilistas e não usuários de drogas ilícitas;
- Indivíduos não usuários de enxaguatórios bucais e não usuários de aparelhos ortodônticos.

4.4.2 Critérios de Exclusão

No grupo caso foram excluídos indivíduos que apresentassem sinais clínicos da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) ou histórico desta alteração.

4.5 MÉTODOS

Os indivíduos e seus responsáveis legais (quando menor de idade) foram contatados e convidados quanto à possibilidade da participação no estudo. Após a explicação completa e pormenorizada sobre a natureza da pesquisa, os indivíduos e/ou o responsável legal assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1 e 2). Os adolescentes entre 16 e 18 anos, que aceitaram participar da pesquisa, assinaram o Assentimento Informado para Adolescentes (APÊNDICE 3).

Todos os participantes da pesquisa responderam a uma ficha clínica (APÊNDICE 4) sobre a história médica pregressa e procedeu-se o exame físico intrabucal. Em seguida, a coleta das células epiteliais esfoliadas foi realizada na lateral da língua pela técnica da citologia em base líquida.

4.5.1 Coleta de dados

A coleta das células foi realizada com um *kit* denominado *Digene Cervical Sampler*[®], composto por um frasco, contendo 1 mL de *Specimen Transport Medium* (STM) e uma escova com cabo longo (FIGURA 3).



FIGURA 3 – KIT *DIGENE CERVICAL SAMPLER*[®]. COMPOSTO POR ESCOVA DE CABO LONGO E FRASCO, CONTENDO *SPECIMEN TRANSPORT MEDIUM* (STM)
FONTE: O AUTOR (2011)

Inicialmente, os indivíduos foram orientados a realizar um enxágue bucal com

água para remover possíveis restos celulares e bactérias. A coleta das células foi realizada tracionando-se levemente a língua com auxílio de uma gaze estéril. Por meio da aplicação da escova de forma suave e em movimentos giratórios no sentido horário (cinco voltas), a coleta foi realizada na porção lateral posterior da língua (FIGURA 4). Em seguida, a escova foi mergulhada no interior do frasco contendo o *STM*, permanecendo imersa neste líquido com o frasco tampado e conservada sob refrigeração (2 a 8° C) (DAKO®, modelo DU330, Campinas, Brasil) até o momento do processamento laboratorial, no Laboratório de Patologia do curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná.



FIGURA 4 - COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DA LATERAL DA LÍNGUA COM ESCOVA CITOLÓGICA
FONTE: O AUTOR (2011)

4.5.2 Processamento Laboratorial

Uma cartela contendo 12 lâminas histológicas (Lamigene®) foi adaptada numa prensa metálica (Prepgene®) juntamente com um filtro contendo uma membrana de policarbonato de 25 mm de diâmetro e 5 µm de porosidade (Filtrogene®) (FIGURA 5A). As lâminas foram identificadas previamente para evitar trocas de material e os frascos foram colocados em um *rack* na mesma sequência das lâminas (FIGURA 5B). A seguir, os frascos foram homogeneizados num agitador de tubos do tipo *Vortex* (modelo AP 56, Phoenix, EUA) em alta velocidade e por tempo mínimo de 20

segundos (FIGURA 6). Uma alíquota de 200 μ L foi transferida do interior do frasco para a superfície do filtro com o auxílio de uma pipeta monocal (FIGURA 7A). A prensa metálica foi fechada por dez segundos, havendo, ao final, a transferência das células que ficaram prensadas sobre a lâmina (FIGURA 7B). Os esfregaços foram fixados em solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos e, em seguida procedeu-se a coloração de Papanicolaou e a impregnação pela prata obtendo-se as lâminas para análise citológica (ANEXO 2 e 3).



FIGURA 5 – EQUIPAMENTO UTILIZADO NO PROCESSAMENTO LABORATORIAL. **A:** PRENSA METÁLICA, CARTELA DE LÂMINAS E O FILTRO. **B:** RACK COM FRASCOS, VORTEX, PRENSA METÁLICA E PIPETA MONOCANAL*

*Imagens gentilmente cedidas pelos professores Dr. Antonio Adilson Soares de Lima e Dra. Maria Ângela Naval Machado

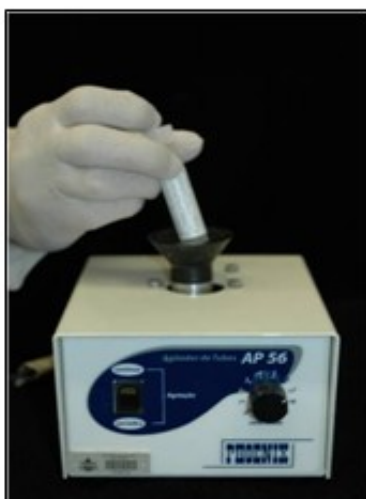


FIGURA 6 - HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS NO VORTEX*

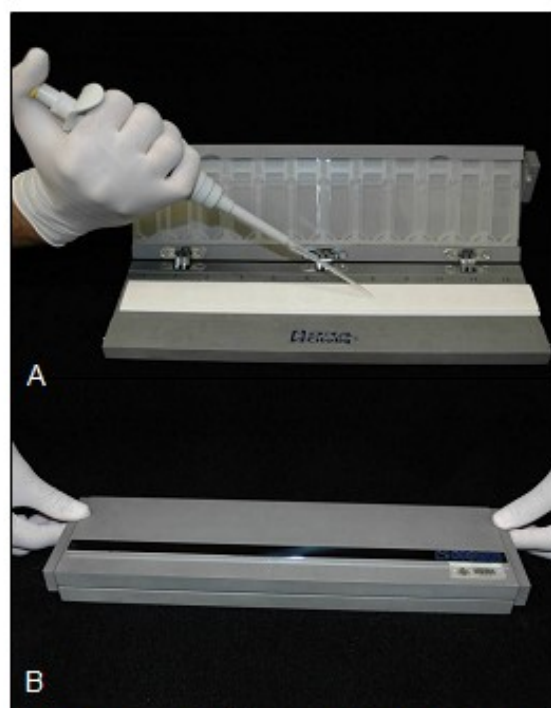


FIGURA 7 – SEQUÊNCIA DA PRENSAGEM DAS LAMINAS. A: ALIQUOTA SENDO DISPENSADA, COM A PIPETA, NA SUPERFÍCIE DO FILTRO B: PRENSA METÁLICA FECHADA, PARA A TRANSFERÊNCIA DO MATERIAL SOBRE A LÂMINA*

*Imagens gentilmente cedidas pelos professores Dr. Antonio Adilson Soares de Lima e Dra. Maria Ângela Naval Machado

4.5.3. Análise morfológica

A análise morfológica e morfométrica dos esfregaços foram feitas por meio da microscopia de luz, utilizando um microscópio binocular modelo BX41 (Olympus®, Japão) adaptado com ocular WH 10X-H/22 (Olympus®, Japão) e objetivas PLAN 40x/125 (Olympus®, Japão) com aumento de 400X.

As lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés. Um único examinador foi previamente treinado quanto ao reconhecimento da presença ou ausência das alterações celulares, quanto ao predomínio celular, quanto à morfometria das células epiteliais e a quantificação das AgNORs.

Os dados analisados de cada lâmina foram anotados em fichas específicas (APÊNDICE 5).

Em relação ao grau de maturação, os esfregaços foram analisados de acordo com o predomínio do tipo celular: superficial anucleada, superficial nucleada, intermediária e basal (FIGURA 8).

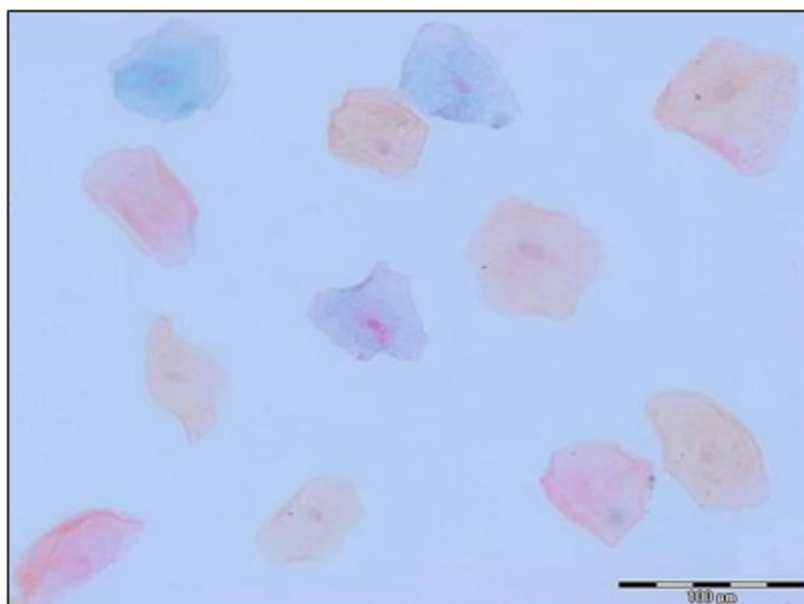


FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIA DE CELULAS EPITELIAIS DA LATERAL DA LINGUA. NUCLEOS E CITOPLASMA EM DIFERENTES GRAUS DE MATURAÇÃO (PAPANICOLAOU, 400X)
FONTE: O AUTOR (2011)

As lâminas também foram classificadas de acordo com os critérios citopatológicos de Papanicolaou usando a técnica de varredura em toda extensão da lâmina.

Os esfregaços foram classificados em cinco classes, de acordo com Papanicolaou (WOYCEICHOSKI *et al.*, 2008; CAMPAGNOLI *et al.*, 2011; POMPERMAYER *et al.*, 2011).

- Classe 0: Material insuficiente ou inadequado para análise;
- Classe I: Células apresentam padrão morfológico normal em todo esfregaço;
- Classe II: Esfregaço normal com células inflamatórias. O esfregaço apresenta características de benignidade, porém, com alterações inflamatórias (mudança na relação núcleo-citoplasma, multinucleação ou presença de halos perinucleares) em pelo menos dois campos;
- Classe III: Esfregaço suspeito. Presença de alterações displásicas apresentando alguns critérios de malignidade, porém com alterações discretas em pelo menos dois campos;
- Classe IV: Esfregaços fortemente suspeitos de malignidade com alterações displásicas. Células da camada basal e parabasal redondas ou ovais, com núcleos em posição central, além de aparecer células com núcleos volumosos e citoplasma reduzido; em pelo menos dois campos;
- Classe V: Presença de alterações compatíveis com neoplasias malignas, exibindo células com núcleo hipercromático, com acentuado pleomorfismo nuclear, espaços vazios e grânulos grosseiros de cromatina. As células podem apresentar mitoses atípicas, pleomorfismo celular e evidente alteração na proporção núcleo-citoplasma em favor do núcleo.

4.5.4 Análise morfométrica

As imagens de 50 células nucleadas de cada lâmina foram capturadas por uma câmera microscópica digital DP 25 (Olympus®, Japão) e o *Software* analisador de imagens - *AnalySIS* (Olympus®, Japão) em um aumento de 400 vezes, de acordo com a metodologia preconizada por Ogden e Cowpe (1989). A captura foi realizada sequencialmente, por campo citológico da lâmina, da esquerda para a direita e de cima para baixo (FIGURA 9). Somente as células que se encontravam estiradas e bem delimitadas foram capturadas.

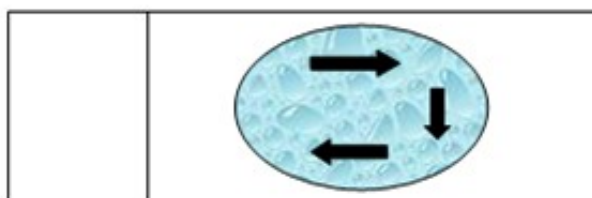


FIGURA 9 – DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA SEQUENCIA PARA LEITURA DE LAMINAS
FONTE: O AUTOR (2011)

As áreas do núcleo (AN) e do citoplasma (AC) foram delimitadas em cada 50 células, usando o cursor digital na ferramenta polígono do *Software* analisador de imagens (FIGURA 10).

Os valores numéricos das medidas da AN e AC foram transferidos para um arquivo do *Excel* (Microsoft Inc., EUA) e a relação AN/AC de cada amostra foi calculada. Após a obtenção das medidas das 50 células por lâmina foi calculada uma média por grupo.

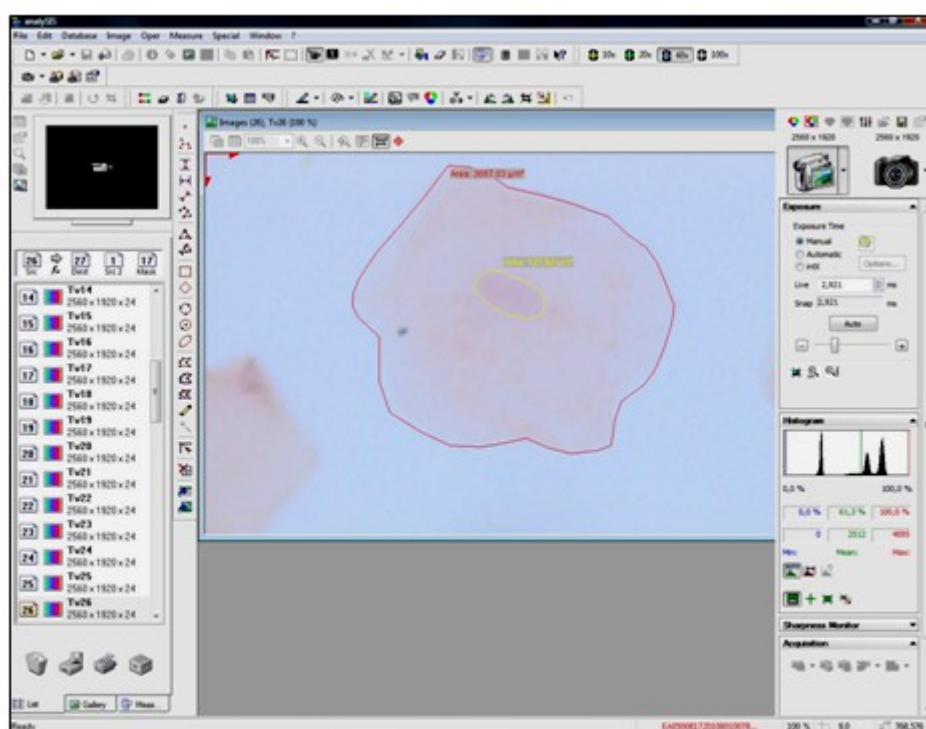


FIGURA 10 – LAYOUT DO PROGRAMA ANALISADOR DE IMAGEM (AnalySIS). VISUALIZAÇÃO DA DELIMITAÇÃO DA ÁREA DO NÚCLEO, DO CITOPLASMA E OS VALORES RESPECTIVOS
FONTE: O AUTOR (2011)

4.5.5 Quantificação de AgNORs

A análise quantitativa das AgNORs foi realizada por meio da microscopia de luz utilizando um microscópio binocular modelo BX41 (Olympus®, Japão) adaptado com ocular WH 10X-H/22 (Olympus®, Japão) e objetivas PLAN 100x/125 (Olympus®, Japão) para imersão (1000X).

O parâmetro utilizado para a contagem foi determinado pela presença de pontos enegrecidos bem definidos no interior dos núcleos, conforme os critérios estabelecidos por Crocker, Boldy e Egan (1989) (FIGURA 11).

O processo de contagem das AgNORs foi realizado por um mesmo examinador treinado. A lâmina foi percorrida em toda sua extensão (FIGURA 9) e o número de pontos escuros corados pela prata foi enumerado nos 100 primeiros núcleos celulares visualizados em cada esfregaço citológico.

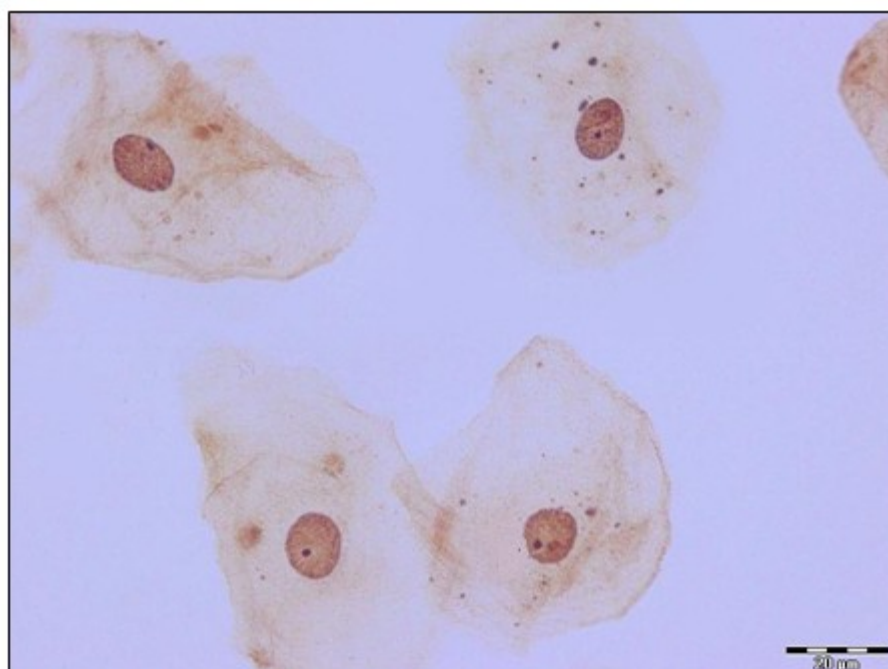


FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIA DAS CELULAS EPITELIAIS EXIBINDO AS AGNORS (AGNORS, 1000X)

Núcleos com ausência de AgNORs não foram incluídos na contagem. Os nucléolos corados por prata semelhantes a um anel foram contados como se fossem um. Quando a agregação de pontos corados não pode ser visualizada como NORs individuais, foi considerado como se fosse um só, como recomendado por Crocker, Boldy e Egan (1989) e Trerè (2000).

4.5.6 Análise estatística

Os dados obtidos para cada variável avaliada foram registrados e tabulados em planilhas no *software* estatístico SPSS versão 17.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA).

4.5.6.1 Análise Morfológica

Para a análise da variável relacionada ao predomínio celular entre os grupos caso e controle, foi aplicado o teste Exato de Fischer ($p < 0,05$). Para a variável relacionada à classificação de Papanicolaou foi aplicado o teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

4.5.6.2 Análise Morfométrica

Para a análise das variáveis morfométricas AN, AC e AN/AC entre os grupos caso e controle, foram aplicados o teste de Shapiro-Wilk para normalidade, Levene para homogeneidade de variâncias e o teste t para amostras independentes, todos com nível de significância de 5%.

4.5.6.3 Quantificação de AgNORs

Visando comparar se havia diferença estatística significativa nos valores médios de AgNORs por núcleo entre o grupo caso e controle, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida foi utilizado o teste de homogeneidade de Levene e o teste t para amostras independentes com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Do total de participantes dos grupos caso e controle, nove eram do sexo masculino (45%) e 11 do sexo feminino (55%). A média de idade dos participantes foi de 11,20 anos ($\pm 3,4$).

Quanto ao tipo racial o grupo caso foi composto por indivíduos leucodermas (35%), melanodermas (30%), feodermas (25%) e xantodermas (10%). No grupo controle a predominância foi do tipo racial leucoderma (40%), seguido por melanoderma (35%), xantoderma (15%) e feoderma (10%).

O tempo médio de TCTH, no grupo caso, foi de 37,05 meses ($\pm 28,8$), variando de 8 a 86 meses. Do total, 11 indivíduos (55%) eram transplantados não aparentados e 9 (45%) haviam sido submetidos ao transplante alogênico.

Os dados obtidos na história médica referentes às medicações utilizadas pelos indivíduos do grupo caso e o tempo de TCTH estão descritos no QUADRO 1.

Amostra	Tempo de TCTH (meses)	Medicamento
1	79	Nenhum
2	32	Prednisolona
3	13	Ácido fólico (Vitamina B ₉), Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim), Polivit A/B (Vitaminas A, D, E, B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , C, B ₇ e B ₁₂)
4	39	Nenhum
5	76	Nenhum
6	20	Azitromicina, Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim), Ciclosporina, Prednisolona, Fenoterol
7	18	Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim), Ácido fólico (Vitamina B ₉)
8	10	Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim) e Ácido fólico (Vitamina B ₉)
9	13	Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim) e Ácido fólico (Vitamina B ₉)
10	9	Hidrocortisona, Ciclosporina, Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim) e Ácido fólico (Vitamina B ₉), Tiamina (Vitamina B ₁), Besilato de Anlodipino
11	84	Nenhum
12	36	Ursacol
13	39	Nenhum
14	81	Loratadina
15	8	Ciclosporina, Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim) e Ácido fólico (Vitamina B ₉), Aciclovir, Captopril, Pídoato de magnésio (Pigdomag), Tiamina (Vitamina B ₁)
16	86	Nenhum
17	8	Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim) e Ácido fólico (Vitamina B ₉), tiamina, ciclosporina
18	33	Levotiroxina sódica
19	9	Ciclosporina, Sulfametoxazol e Trimetoprima (Bactrim) e Ácido fólico (Vitamina B ₉)
20	48	Propranolol

QUADRO 1 – MEDICAMENTOS USADOS PELOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CASO E TEMPO DE TCTH

FONTE: O AUTOR (2011)

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As células das camadas superficiais nucleadas (5%) e as das camadas superficiais anucleadas (95%) apresentaram a mesma distribuição entre os grupos (TABELA 1), sem diferença estatisticamente significativa.

TABELA 1 – PREDOMINÂNCIA CELULAR NOS ESFREGAÇOS BUCAIS DO GRUPO CASO E NO GRUPO CONTROLE

Grupo	Células superficiais nucleadas		Células superficiais anucleadas		Células da camada intermediária		Células da camada basal		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Caso	1	5	19	95	-	-	-	-	1,00
Controle	1	5	19	95	-	-	-	-	

Teste Exato de Fischer ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2011)

De acordo com a classificação de Papanicolaou, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos grupo caso e controle. Os valores encontrados foram iguais para ambos os grupos, sendo que 55% dos esfregaços pertenciam a Classe I e 45% a Classe II (TABELA 2).

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFREGAÇOS BUCAIS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE PAPANICOLAOU NO GRUPO CASO E NO GRUPO CONTROLE

Classificação	Caso n(%)	Controle n(%)	Valor de p
Classe 0	0 (-)	0	1,00
Classe I	11(55)	11(55)	
Classe II	9(45)	9(45)	
Classe III	0 (-)	0	
Classe IV	0 (-)	0	
Classe V	0 (-)	0	
Total	20	20	

Teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2011)

Alterações celulares e nucleares como nucléolos múltiplos, hipercromatismo, anormalidades de distribuição na cromatina, polimorfismo, discrepância na maturação celular ou figuras mitóticas aberrantes não foram observadas nos esfregaços.

5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Houve um aumento, estatisticamente significativo, da AN e AC no grupo caso em relação ao grupo controle (FIGURA 12).

A relação AN/AC está diminuída no grupo caso quando comparado ao grupo controle, com valores significantes estatisticamente (TABELA 3).

TABELA 3 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DAS VARIÁVEIS AN, AC E AN/AC NO GRUPO CASO E NO GRUPO CONTROLE

Variável	Grupo Caso		Grupo Controle		Valor de p
	n	Média±DP	n	Média±DP	
AN (μm^2)	20	71, 85 $\mu\text{m}^2 \pm 15, 05$	20	55, 21 $\mu\text{m}^2 \pm 8, 63$	< 0,01*
AC (μm^2)	20	2127, 48 $\mu\text{m}^2 \pm 441, 20$	20	1441, 61 $\mu\text{m}^2 \pm 247, 23$	< 0,01*
AN/AC	20	0,03 $\pm 0, 006$	20	0,04 $\pm 0,005$	< 0,01*

Teste t (p<0,05)

* Diferença Estatística

FONTE: O autor (2011)

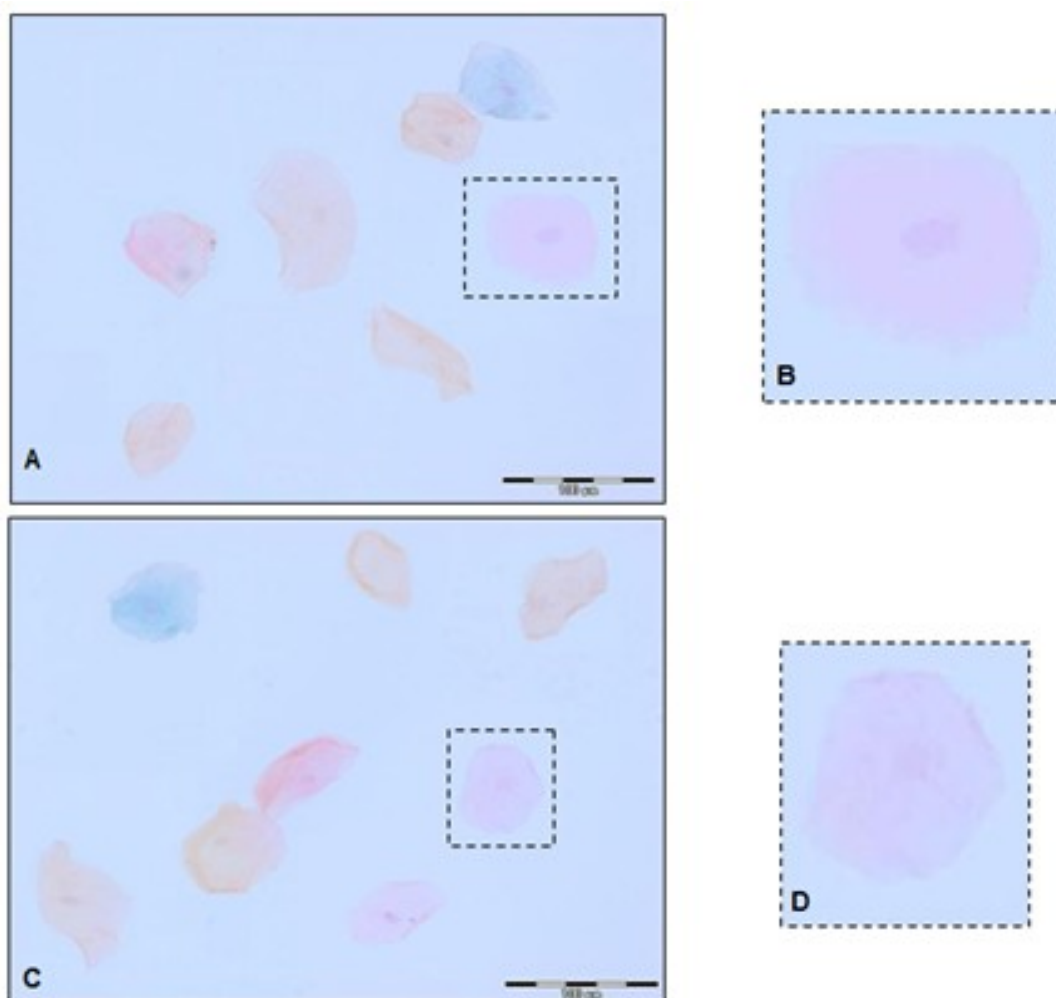


FIGURA 12 – FOTOMICROGRAFIA DAS CELULAS EPITELIAIS DOS GRUPOS CASO E CONTROLE. **A E B:** CELULAS EPITELIAIS DOS INDIVIDUOS COM ANEMIA DE FANCONI EXIBINDO AUMENTO DA AREA DO NUCLEO E DO CITOPLASMA. **C E D:** CELULAS EPITELIAIS DE INDIVIDUOS SAUDÁVEIS (PAPANICOLAOU, 400X)
 FONTE: O AUTOR (2011)

5.3 ANÁLISE DA QUANTIFICAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (AgNORs)

As AgNORs estavam localizadas no interior do núcleo e foram visualizadas como pequenas estruturas com morfologia predominantemente arredondada, de coloração castanho claro ou negro, em número e tamanhos variáveis (FIGURA 13).

O número médio de AgNORs por núcleo foi superior no grupo caso em relação ao grupo controle, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 4).

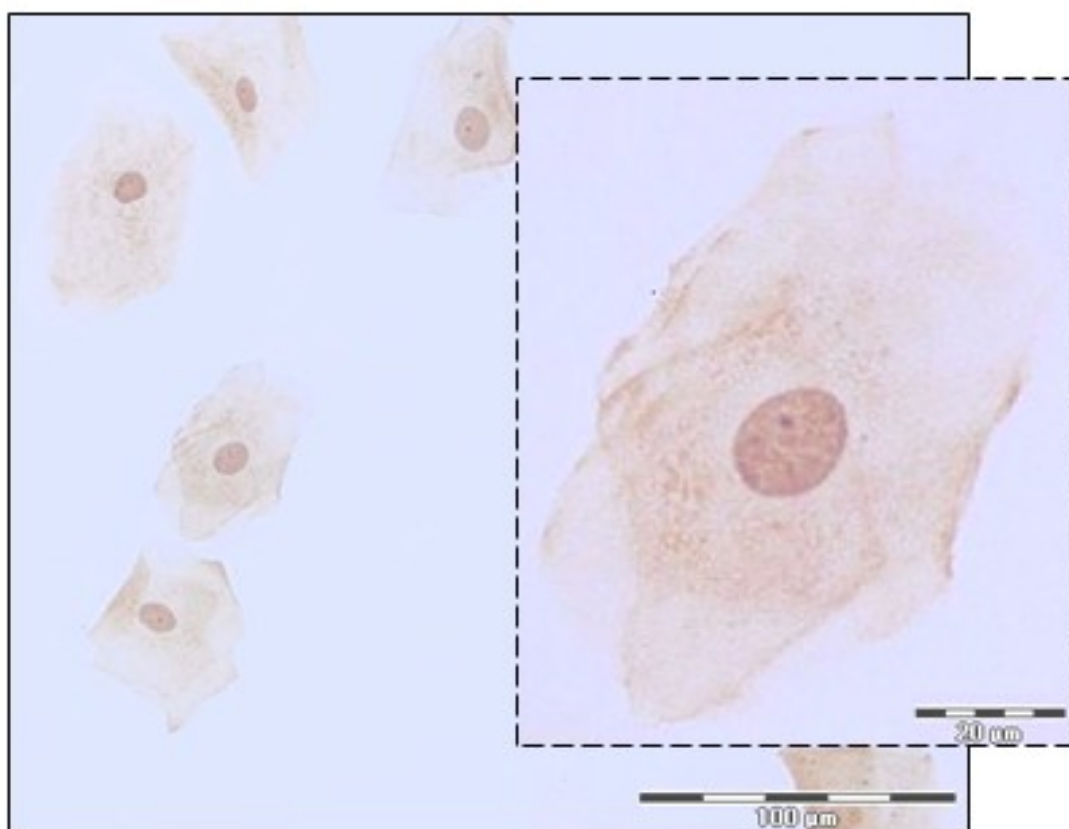


FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA EXIBINDO AS AGNORS NO INTERIOR DO NÚCLEO DAS CELULAS EPITELIAIS (AGNORS, 400 X E 1000X)

TABELA 4 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DA VARIÁVEL AGNORS POR NÚCLEO SEGUNDO OS GRUPOS CASO E CONTROLE

Grupos	n	Média	DP	Valor de p
Caso	20	3,05	± 0,44	0,28
Controle	20	2,93	± 0,20	

Teste t ($p < 0,05$)

FONTE: O autor (2011)

6 DISCUSSÃO

A Anemia de Fanconi é caracterizada pela instabilidade genômica, alterações hematológicas progressivas e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas e tumores sólidos (ROSENBERG *et al.*, 2005). Além disso, apresenta ampla heterogeneidade fenotípica e genotípica com complexo diagnóstico e tratamento de suas manifestações (ALTER, 2003).

O estudo multidisciplinar dos doentes da AF se faz importante e facilita o diagnóstico e o tratamento das diversas alterações que compõem a síndrome. O exame intrabucal nessa população é relevante, pois o CEC na região de cabeça e pescoço é o tumor sólido mais comum em doentes da AF, principalmente após o TCTH. O diagnóstico precoce e o acompanhamento de lesões com potencial de malignização é fundamental para um bom prognóstico, menor mortalidade e morbidade nesses indivíduos (ALTER, 2003; ACHA *et al.*, 2005).

Mudanças morfométricas no epitélio da mucosa bucal foram demonstradas em estudos citológicos de doenças sistêmicas (POMPERMAYER *et al.*, 2011; ALBERTI *et al.*, 2003; JAJARM; MAHTASHAM; RANGIANI, 2008), porém ainda não foram realizados em indivíduos com AF.

A AF é uma AA congênita caracterizada pela insuficiência do processo de hematopoiese, com desenvolvimento de anemia grave, neutropenia e trombocitopenia (PASQUINI, 2000).

Estudos citológicos relacionaram alguns tipos de anemias nutricionais à alterações nas dimensões do núcleo e do citoplasma, como na anemia por deficiência de vitamina B₁₂ e de ácido fólico ou ainda na anemia por deficiência de ferro (BOEN, 1957; BODDINGTON, 1959; FARRANT, 1960; MONTGOMERY; RIZEK; FINE, 1961).

Análises dos efeitos da anemia nas células epiteliais da mucosa oral mostraram diferenças de acordo com o tipo de anemia encontrada. Graham e Rheault (1954) e Boen (1957) observaram um aumento AN e AC nas células epiteliais bucais em indivíduos com anemia perniciosa, ou seja, por deficiência de vitamina B₁₂.

Farrant (1960) relatou um aumento da AN de células epiteliais da mucosa bucal em indivíduos com anemia perniciosa. Boddington e Spriggs (1959) e Macleod, Hamilton e Soames (1988) também encontraram aumento da AN, porém em pacientes com anemia megaloblástica, por deficiência de vitamina B₁₂ e ácido fólico. Monto, Rizek e Fine (1961) e Macleod, Hamilton e Soames (1988) relataram aumento na AN em pacientes com anemia por deficiência de ferro.

Alterações na AN/AC também foram relatadas em estudos sobre anemias nutricionais (GRAHAM E RHEAULT, 1954; BODDINGTON, 1959; MONTO, RIZEK E FINE, 1961).

A avaliação morfométrica das anemias demonstrou que após o tratamento das deficiências nutricionais as alterações celulares foram reversíveis (GRAHAM E RHEAULT, 1954; BODDINGTON, 1959). Na AF, o único tratamento curativo para a eritropenia, que causa a anemia grave, é o TCTH (ALTER, 1996; PASQUINI *et al.*, 2003).

No presente estudo observou-se no grupo caso que mesmo submetidos ao TCTH, houve aumento na AN e na AC e diminuição da relação AN/AC das células epiteliais. Embora o TCTH restabeleça a função hematológica dos doentes da AF, este não foi capaz de reverter as alterações morfométricas das células epiteliais.

As hipóteses sugeridas para justificar a variação morfométrica celular encontrada na AF, após o TCTH, podem apresentar diferentes abordagens.

A primeira hipótese sugere que após o transplante, algumas células alteradas da AF possam permanecer na medula óssea, preservando características inerentes a AF, como alterações decorrentes da anemia grave, leucopenia e trombocitopenia (ALTER, 2003). Hipoteticamente sugere-se, que as alterações celulares comuns em indivíduos anêmicos, como o aumento da AN e AC seja mantida após o TCTH e que possam ser visualizadas como alterações morfométricas nas células epiteliais nos doentes da AF.

Outra hipótese a ser considerada está relacionada a anemia nutricional por deficiência de vitamina B₁₂ e ácido fólico que pode ocorrer após o TCTH. Isto ocorre em virtude da diminuição da ingestão e absorção dessas vitaminas, decorrentes das mucosites, enterites, gastroparesia, náuseas, vômitos, diarreias e hipossalivação que estes indivíduos desenvolvem (ALBERTINI; RUIZ, 2004).

A deficiência da vitamina B₁₂ pode ser uma das justificativas para tentar explicar o mecanismo responsável pelas alterações nas áreas do núcleo e do

citoplasma nas anemias. Na ausência de vitamina B₁₂ podem ocorrer alterações na síntese de ácidos nucleicos, que reduz a taxa de divisão celular e em consequência causa um aumento da célula e do núcleo (FARRANT, 1960).

A suplementação vitamínica com ácido fólico e vitamina B₁₂ estava sendo prescrita para 40% dos indivíduos do grupo caso, no momento da coleta das células epiteliais da língua (QUADRO 1), demonstrando a deficiência de vitaminas desenvolvida por esses indivíduos após o TCTH. Observa-se que os indivíduos que estavam recebendo a suplementação apresentavam tempo de TCTH inferior ou igual a 18 meses, ou seja, estavam mais suscetíveis as complicações decorrentes do pós TCTH, como a diminuição da ingestão e absorção dessas vitaminas. Os demais indivíduos do grupo caso, apresentavam tempo superior de TCTH e não estavam recebendo, no momento da coleta, a suplementação de vitaminas.

Não foi realizado um perfil metabólico nutricional que confirmasse a deficiência de vitaminas, porém, todos os indivíduos do grupo caso, que estavam recebendo ou não complementação vitamínica, apresentaram alterações morfométricas.

Outra hipótese a ser discutida está relacionada a presença clínica da atrofia papilar, comum em indivíduos com AF (TEKCICEK *et al.*, 2007). No atual estudo, observou-se que todos os doentes da AF apresentavam clinicamente a atrofia papilar, variando de intensidade leve à severa. No entanto, apesar dessa constatação clínica, os achados morfométricos sugerem um aumento celular, não condizente com a redução da AN e da AC, característicos da atrofia de células epiteliais. A atrofia epitelial é caracterizada por uma diminuição do tamanho das células e por perda de substância em resposta a uma adaptação celular (POMPERMAYER *et al.*, 2011).

A última hipótese sugere que a condição genética imutável da doença, caracterizada pela instabilidade cromossômica e o defeito no reparo do DNA pode colaborar para possíveis alterações morfométricas nas células epiteliais de indivíduos com AF.

O mecanismo responsável pelas alterações morfométricas na AF, observadas neste estudo, não pode ser elucidado. Porém pode-se sugerir que as alterações genéticas e as alterações hematológicas inerentes a AF, não corrigidas pelo TCTH, podem afetar as células epiteliais da língua desses indivíduos, levando às alterações morfométricas.

Quanto a morfologia observou-se predominância de células da camada superficial nucleada e anucleada em ambos os grupos. Como o sítio de coleta foi a lateral da língua, a presença de ceratinócitos anucleados e nucleados era esperada. Além disso, a citologia esfoliativa raramente remove células das camadas mais profundas do epitélio, principalmente quando este está hígido (OGDEN; COWPE; WIGHT, 1997). Os achados deste estudo corroboram com aqueles encontrados por Montgomery e Von Haam (1951), que afirmaram que existe uma maior predominância de células anucleadas na língua usando a citologia esfoliativa.

Esfregaços com padrão morfológico normal e com alterações inflamatórias (classe II) foram observados. Esse resultado é justificável, pois as amostras foram coletadas no epitélio bucal hígido. A língua é um local contaminado por microorganismos, isso explicaria a presença de células inflamatórias nos esfregaços Classe II de Papanicolaou.

No presente estudo a quantificação de AgNOR foi usada como um marcador da proliferação celular devido a alta predisposição ao desenvolvimento do CEC após o TCTH (ROSENBERG *et al.*, 2005) e as características genéticas, como a instabilidade cromossômica e os defeitos no reparo do DNA na AF (AUERBACH, 2009)

No entanto, não foi demonstrada diferença estatística significativa entre os grupos caso e controle no número de AgNORs por núcleo, demonstrando que na mucosa hígida dos doentes de Fanconi, mesmo com a suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento de CEC e a instabilidade cromossômica, não foi possível encontrar alterações de proliferação celular.

Novos estudos devem ser realizados para investigar os mecanismos envolvidos nas alterações celulares da mucosa bucal de indivíduos com Anemia de Fanconi, principalmente relacionados ao desenvolvimento precoce do carcinoma espinocelular, visando o diagnóstico, reduzindo a morbidade e a mortalidade nesta população.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou:

- Aumento na área do núcleo das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o TCTH;
- Aumento na área do citoplasma das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o TCTH;
- Diminuição da relação núcleo-citoplasma das células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o TCTH;
- Não ocorreram alterações na quantificação de AgNORs em células epiteliais da língua de doentes com Anemia de Fanconi após o TCTH.

REFERÊNCIAS

ACHA, A. *et al.* Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v. 10, n. 2, p. 95-102, mar./abr. 2005.

AÇIKGÖZ, A. *et al.* Oral and dental findings in Fanconi's anemia. **Pediatr Hematol Oncol**, New York, v. 22, n. 6, p. 531-539, 2005.

ADEYEMI, B.F. *et al.* A study of the utility of silver nucleolar organizer regions in categorization and prognosis of salivary gland tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 102, n. 4, p. 513-520, out. 2006.

ALBERTINI, S.; RUIZ, M. A. Nutrição em transplante de medula óssea: a importância da terapia nutricional. **Arq Ciênc Saúde**, Umuarama, v. 11, n. 3, p.182-188, jul./set. 2004.

ALBERTI, S. *et al.* Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 32, n. 9, p. 538-543, out. 2003.

ALTER, B. P.; KUPFER G. **Fanconi Anemia**. In: Gene Reviews. University of Washington, Seattle, 2011. e-book. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk1401/>> Acesso em: 25/11/2011.

ALTER, B. P. Aplastic Anemia: Pediatric Aspects. **Oncologist**, Dayton, v. 1, n. 6, p. 361-366, 1996.

ALTER, B. P. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. **Cancer**, New York, v.15, n. 97, p. 425-440, jan. 2003.

ALTER, B. P. *et al.* Fanconi anemia: adult head and neck cancer and hematopoietic mosaicism. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Chicago, v. 131, n. 7, p. 635-639, jul. 2005.

ALTER, B. P. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. **Pediatr Transplant**, Copenhagen, v. 9, n. 7, p. 81-86, dez. 2005.

ARAÚJO, M. R de. *et al.* Fanconi's anemia: clinical and radiographic oral manifestations. **Oral Dis**, Copenhagen, v.13, n. 3, p. 291-295, 2007.

ARAÚJO, M. R de. *et al.* High prevalence of oral human papillomavirus infection in Fanconi's anemia patients. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 572-576, set. 2011.

ASLAN, D. Fanconi anemia (FA) and squamous cell carcinoma in childhood. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 70, n. 11, p. 1995-1997, nov. 2006.

AUERBACH, A. D. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 31, n. 668, p. 4-10, jul. 2009.

BODDINGTON , M. M.; SPRIGGS, A. I. The epithelial cells in megaloblastic anaemias. **J Clin Pathol**, London, v. 12, n. 3, p. 228-234, mai. 1959.

BODDINGTON, M. M. Changes in buccal cells in the anaemias. **J Clin Pathol**, London, v. 12, n. 3, p. 222-227, mai. 1959.

BOEN, S. T. Changes in the nuclei of squamous epithelial cells in pernicious anaemia. **Acta Med Scand**, Stockholm, v. 159, n. 6, p. 425-431, 1957.

BUSTOS, A. O. *et al.* Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores. **Med Oral**, Valencvia, v. 9, p. 197-203, 2004.

BUTTURINI, A. *et al.* Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. **Blood**, New York, v. 84, n. 5, p.1650-1655, set. 1994.

CAMPAGNOLI, E. B. *et al.* Comparação Entre a Citologia em Base Líquida e a Citologia Esfoliativa Convencional no Diagnóstico de Carcinomas da Região de Cabeça e Pescoço. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v. 11, n. 1, p. 65-71, jan./mar. 2011.

CANÇADO, R. P.; YURGEL, L. S.; FILHO, M. S. Comparative analyses between the smoking habit frequency and the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of smokers' normal buccal mucosa. **Tob Induc Dis**, Essen, v. 15, n. 1, p. 43-49, mar. 2004.

CANO, L.C. *et al.* Análisis del marcador tisular AgNOR en leucoplasia y carcinoma escamocelular oral **Medicina Oral**, Madrid, v. 7, p. 17-25, 2002.

COWPE, J.G; LONGMORE, R.B; GREEN, M.W. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. **J R Soc Med**, London, v. 81, n. 9, p. 509-513, set. 1988.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A. R.; EGAN, M. J. How should we count? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**, London, v. 158, p. 185-188, 1989.

D'ANDREA, A. D. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. **N Engl J Med**, Boston, v. 20, n. 362, p. 1909-1919, mai. 2010.

DEEG, H. J. *et al.* Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. **Blood**, New York, v. 87, n. 1, p. 386-392, jan. 1996.

DERENZINI, M.The AgNORs. **Micron**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 117-120, abr. 2000.

DIGENE do Brasil. **Manual Técnico de Treinamento**. São Paulo: Digene, 2002

EPSTEIN, J. B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v. 68, n.10, p. 617-621, nov. 2002.

FARRANT, P. C. Nuclear changes in squamous cells from buccal mucosa in pernicious anaemia. **Br Med J**, London, v. 1, n. 5187, p.1694-1697, jun. 1960.

FREITAS, M. D. *et al.* Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. **Med Oral**, Valencia, v. 9, p. 355-361, 2004.

FONTES, P. C. *et al.* Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. **Head Neck Pathol**, Secaucus, v. 2, n. 3, p. 157-162, set. 2008.

GIAMPIETRO, P. F. *et al.* The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. **Pediatrics**, Springfield, v. 91, n. 6, p. 1116-1120, jun. 1993.

GUARDIOLA, P. *et al.* Acute graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia or acquired aplastic anemia undergoing bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors: risk factors and influence on outcome. **Blood**, New York, v. 103, n. 1, p. 73-77, jan, 2004.

GUIDELINES for Diagnosis and Management: Fanconi Anemia. Anemia Research Fund. 3 ed. 2008. Disponível em : <www.fanconi.org> acesso em 22/11/2011.

GRAHAM, R. M.; RHEAULT, M. H. Characteristic cellular changes in epithelial cells in pernicious anemia. **J Lab Clin Med**, St. Louis, v. 43, n. 2, p. 235-245, fev. 1954.

HAYAMA, F. H. *et al.* Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v. 10, n. 2, p. 115-122, mar./abr. 2005.

HILDEBRAND, L. D. *et al.* Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v. 15, n. 2, p. 328-334, mar. 2010.

JANSISYANONT, P.; PAZOKI, A.; ORD, R. A. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi's anemia. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 58, n.12, p. 1454-1457, dec. 2000.

JACOBS, P.; KARABUS, C. Fanconi's anemia. A family study with 20-year follow-up including associated breast pathology. **Cancer**, New York, v. 54, n. 9, p. 1850-1853, nov. 1984.

JAJARM, H. H. *et al.* Evaluation of oral mucosa epithelium in type II diabetic patients by an exfoliative cytology method. **J Oral Sci**, Tokyo, v. 50, n. 3, p. 335-340, set. 2008.

KELES, M. *et al.* Exfoliative cytology of oral mucosa in kidney transplant patients: a cytomorphometric study. **Transplant Proc**, New York, v. 43, n. 3, p. 871-875, abr. 2011.

KOUBIK, A. C. *et al.* Comparative study of chronological, bone, and dental age in Fanconi's anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, New York, v. 28, n. 4, p. 260-262, 2006.

KUJAN, O. *et al.* Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa. **Oral Oncol**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 810-818, set. 2006.

KUTLER , D. I. *et al.* A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, New York, v. 101, n. 4, p. 1249-1256, fev. 2003a.

KUTLER , D. I. *et al.* High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Chicago, v. 129, n. 1, p. 106-112, jan. 2003b.

LUSTIG, J. P. *et al.* Head and neck carcinoma in Fanconi's anaemia: report of a case and review of the literature. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 68-72, jan. 1995.

MACLEOD, R. I.; HAMILTON , P. J.; SOAMES, J. V. Quantitative exfoliative oral cytology in iron-deficiency and megaloblastic anemia. **Anal Quant Cytol Histol**, St. Louis Mo, v. 10, n.3, p. 176-180, jum. 1988.

MATHEW, C. G. Fanconi anaemia genes and susceptibility to cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 25, n. 43, p.5875-5884, set. 2006.

MATTIOLI, T. M. *et al.* Salivary flow rate, calcium, urea, total protein and amylase levels in fanconi anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, New York, v. 32, n. 2, p. 46-49, mar. 2010.

MILLEN , F. J. *et al.* Oral squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anaemia. **Br J Haematol** , Oxford, v. 99, p. 99, 1997.

MONTGOMERY, P. W. A study of exfoliative cytology of normal human oral mucosa. **J Dent Res**, Chicago, v. 30, n. 1, p. 12-18, fev. 1951.

MONTGOMERY, P. W.; VON HAAM, E. A study of the exfoliative cytology in patients with carcinoma of the oral mucosa. **J Dent Res**, Chicago, v. 30, n. 3, p. 308-313, jun. 1951.

MONTO, R. W.; RIZEK, R.A; FINE, G. Observations on the exfoliative cytology and histology of the oral mucous membranes in iron deficiency. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 14, p. 965-974, ago. 1961.

NAVONE, R. *et al.* The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. **Cytopathology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 356-360, dec. 2007.

NAVONE, R.; PENTENERO, M.; GANDOLFO, S. Liquid-based cytology in oral cavity squamous cell cancer. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 77-81, abr. 2011.

NOWZARI, H. *et al.* Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. **J Periodontol**, Chicago, v. 72, n. 11, p. 1601-1606, 2001.

OGDEN , G . R; COWPE, J. G. Quantitative cytophotometry analysis as an aid to the detection of recurrent oral cancer. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v. 27, n. 3, p. 224-228, jun. 1989.

OGDEN , G. R.; COWPE, J. G.; WIGHT, A. J. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 26, n. 5, p. 201-205, mai, 1997.

OPINYA, G. N.; KAIMENYI, J. T.; MEME, J. S. Oral findings in Fanconi's anemia. A case report. **J Periodontol**, Chicago, v. 59, n. 7, p. 461-463, 1988.

OTAN , F.; AÇIKGÖZ, G.; SAKALLIOGLU, U.; OZKAN, B. Recurrent aphthous ulcers in Fanconi's anaemia: a case report. **Int J Paediatr Dent**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 214-217, mai, 2004.

PAIVA, R. L. *et al.* AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. **Anal Quant Cytol Histol**, St. Louis Mo, v. 26, n. 3, p. 175-180, 2004.

PASQUINI, R. *et al.* Carcinoma de células escamosas em língua pós-transplante de medula óssea por Anemia de Fanconi. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, São José do Rio Preto, v. 25, n. 4, p. 239-246, 2003.

PASQUINI, R. Transplante de medula óssea em anemia aplástica. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 219-231, jul./set. 2000.

PÉREZ-SAYÁNSM, M . *et al.* Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. **Biotech Histochem**, Baltimore, v. 85, n. 3, p. 177-187, abr. 2010.

PLOTON, D. *et al.* Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J**, London, v. 18, n. 1, p. 5-14, jan. 1986.

POMPERMAYER, A. B. *et al.* HIV infection induces morphometrical changes on the oral (buccal mucosa and tongue) epithelial cells. **Curr HIV Res**, Hilversum, v. 9, n. 1, p. 11-16, jan. 2011.

RAMAESH, T. *et al.* Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 83-86, fev. 1998.

REINHARD, H. *et al.* Squamous cell carcinoma of the tongue in a 13-year-old girl with Fanconi anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, New York, v. 29, n. 7, p. 488-491, jul. 2007.

REMMERBACH, T. W. *et al.* Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. **Anal Cell Pathol**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 139-146, 2003.

ROSENBERG, P. S.; GREENE, M. H.; ALTER, B. P. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. **Blood**, New York, v. 101, n. 3, p. 822-826, fev. 2003.

ROSENBERG, P. S.; HUANG, Y.; ALTER, B. P. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. **Blood**, New York, v. 104, n. 2, p. 350-355, jul. 2004.

ROSENBERG, P. S. *et al.* Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. **Blood**, New York, v. 105, n. 1, p. 67-73, 2005.

ROSENBERG, P. S.; TAMARY, H.; ALTER, B. P. How High Are Carrier Frequencies of Rare Recessive Syndromes? Contemporary Estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. **Am J Med Genet Part A**, Hoboken, v. 155, p. 1877-1883, 2011.

SAGASETA de ILURDOZ, M. *et al.* Updating Fanconi's anaemia. **An Sist Sanit Navar**, Pampola, v. 26, n. 1, p. 63-78, jan./abr. 2003.

SALUM, F. G. *et al.* Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. **Braz Dent J**, Riberão Preto, v. 17, n. 2, p. 161-165, 2006.

SILVERMAN, S.; BECKS, H.; FARBER, S. M.J The diagnostic value of intraoral cytology. **Dent Res**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 195-205, abr. 1958.

SOARES, M. F. *et al.* Early presentation of squamous cell carcinoma after bone marrow transplantation in a boy with Fanconi anemia. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 40, n. 4, p. 276-279, 2004.

SOCIÉ, G. *et al.* Increased incidence of solid malignant tumors after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. **Blood**, New York, v. 78, v. 2, p. 277-279, jul. 1991.

SOCIÉ, G. *et al.* Transplantation for Fanconi's anaemia: long-term follow-up of fifty patients transplanted from a sibling donor after low-dose cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning. **Br J Haematol**, Oxford, v. 103, n. 1, p. 249-255, out. 1998.

TEKCICEK, M. *et al.* Oral and dental findings in children with Fanconi anemia. **Pediatr Dent**, Chicago, v. 29, n. 3, p. 248-252, 2007.

TRERÈ, D . AgNOR staining and quantification. **Micron**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 127-131, abr. 2000.

WOYCEICHOSKI, I. E. *et al.* Oral Cytomorphometric analysis of crack cocaine effects on the oral mucosa. **Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 105, n. 6, p. 745-749, jun. 2008.

YUE, L.; IWAI, M.; FURUTA, I. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in tongue squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 70-76, jan. 1999.

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menores de idade

Título: Análise citológica e quantitativa das regiões organizadoras nucleolares da mucosa bucal de crianças e adolescentes com Anemia de Fanconi

Pesquisador: Anna Clara Duszczak D'Agulham

Local da Pesquisa: Ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas.

Endereço: Rua General Carneiro nº 181 - 15º andar - Tel:(41) 3360-1007

Alto da Glória - Curitiba – PR

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para seu filho (a) participar do estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve concordar em participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

O câncer bucal é um tumor maligno que se desenvolve a partir de uma célula que sofre uma série de alterações genéticas. Pode acometer lábio, mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua e assoalho da boca. Os fatores que podem levar ao câncer de boca são idade superior a 40 anos, vício de fumar cachimbos e cigarros, consumo de álcool e a presença de raras doenças genéticas. Por esse motivo é importante um controle e acompanhamento de populações com esse histórico.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivo avaliar as células da lateral da língua para analisar sua forma, tamanho e proliferação.

SELEÇÃO

Poderão participar da pesquisa crianças e adolescentes de 5 à 21 anos, com Anemia de Fanconi e que a realização Transplante de Medula Óssea (TMO) à pelo menos 6 meses.

Também podem participar da pesquisa crianças e adolescentes de 5 à 21 anos que não apresentem qualquer doença sistêmica.

Não poderão participar do estudo indivíduos com lesões na boca, fumantes ou consumidores de bebidas alcoólicas, usuários de enxaguatórios bucais, indivíduos com aparelhos ortodônticos e usuários de drogas.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Caso seu filho (a) participe da pesquisa, será necessário responder algumas perguntas sobre a saúde dele (a) e realizar um exame na boca. Este exame é feito passando uma escovinha rapidamente na lateral da língua, como se você estivesse escovando seus dentes.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou seu filho (a) perderá qualquer benefício ao qual vocês têm direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre seu filho (a). Em todos esses registros um código substituirá o nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com o investigador do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o investigador do estudo ou sua equipe (Anna Clara Duszczak D'Agulham 3232 6452/9166 4288). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu, _____, portador (a)
do RG _____, responsável pelo menor
_____, li e discuti com o
investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste
documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar sobre a participação
do meu filho (a) neste estudo, e que eu posso interromper a participação a qualquer
momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo
sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive
a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram
respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de
Consentimento Informado.

NOME DO RESPONSÁVEL
(Se menor ou incapacitado)

ASSINATURA

DATA

NOME DO INVESTIGADOR
(Pessoa que aplicou o TCLE)

ASSINATURA

DATA

APÊNDICE 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de idade

Título: Análise citológica e quantitativa das regiões organizadoras nucleolares da mucosa bucal de crianças e adolescentes com Anemia de Fanconi.

Pesquisador: Anna Clara Duszczak D'Agulham

Local da Pesquisa: Ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas.

Endereço: Rua General Carneiro nº 181 - 15º andar - Tel:(41) 3360-1007

Alto da Glória - Curitiba - PR

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você e seus familiares as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

O câncer bucal é um tumor maligno que se desenvolve a partir de uma célula que sofre uma série de alterações genéticas. Pode acometer lábio, mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua e assoalho da boca. Os fatores que podem levar ao câncer de boca são idade superior a 40 anos, vício de fumar cachimbos e cigarros, consumo de álcool e a presença de raras doenças genéticas. Por esse motivo é importante um controle e acompanhamento de populações com esse histórico.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivo avaliar as células da lateral da língua para analisar sua forma, tamanho e proliferação.

SELEÇÃO

Poderão participar da pesquisa crianças e adolescentes de 5 à 21 anos, com Anemia de Fanconi e que a realização Transplante de Medula Óssea (TMO) à pelo menos 6 meses.

Também podem participar da pesquisa crianças e adolescentes de 5 à 21 anos que não apresentem qualquer doença sistêmica.

Não poderão participar do estudo indivíduos com lesões na boca, fumantes ou consumidores de bebidas alcoólicas, usuários de enxaguatórios bucais, indivíduos com aparelhos ortodônticos e usuários de drogas.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Caso você participe da pesquisa, será necessário responder algumas perguntas sobre a sua saúde e realizar um exame na sua boca. Este exame é feito passando uma escovinha rapidamente na lateral da língua, como se você estivesse escovando seus dentes.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com o investigador do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiverem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o investigador do estudo ou sua equipe (Anna Clara Duszczak D'Agulham 3232 6452/9166 4288). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO INVESTIGADOR
(Pessoa que aplicou o TCLE)

ASSINATURA

DATA

APÊNDICE 3

Termo de Assentimento para Adolescentes

Título: Análise citológica e quantitativa das regiões organizadoras nucleolares da mucosa bucal de crianças e adolescentes com Anemia de Fanconi.

Investigador: Anna Clara Duszczak D'Agulham

Local da pesquisa:

- () Ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas do Paraná
() Clínica de Odontologia da Universidade Federal do Paraná

Eu, _____ estou sendo convidado a participar deste estudo. Informações serão explicadas para mim pela pesquisadora Anna Clara Duszczak D'Agulham.

Por que este estudo está sendo feito?

Este estudo tem como objetivo avaliar as células do lado da língua para analisar sua forma, tamanho e reprodução.

O que terei de fazer?

Você será convidado a responder algumas perguntas por primeiro. Depois será feito um exame da língua. Você deverá colocá-la para fora da boca e a pesquisadora irá passar uma escova (parecida com uma escova de dente) na lateral da sua língua.

Sentirei algum efeito em participar desta pesquisa?

Não, pois a única coisa que você irá sentir é a sensação da escova na sua língua

Que benefícios poderia ter em participar do estudo?

Com um exame muito simples você vai ficar sabendo se existe alguma mudança na forma, tamanho e reprodução das células, que podem ser sinal de alguma doença.

Posso me recusar a participar do estudo?

Sim, você não precisa participar deste estudo se não quiser. E pode sair a qualquer momento e ninguém irá ficar bravo com você. O médico/dentista continuará cuidando de você. Você pode fazer perguntas sobre este estudo a qualquer momento, através dos telefones da pesquisadora Anna Clara Duszczak D'Agulham: 9166 4288 e 3232 6452.

Eu aceito participar deste estudo

NOME DO ADOLESCENTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO INVESTIGADOR

ASSINATURA

DATA

APÊNDICE 4

Ficha clínica

Data: ____/____/____

DADOS DO PACIENTE

CODIFICAÇÃO:

Nome paciente: _____

Nome do Acompanhante: _____

Endereço: _____ nº: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

- _____ Telefone: _____ Celular: _____

HISTÓRIA MÉDICA

1 Idade em anos

2 Data de nascimento

3 Sexo Feminino ☐ Masculino ☐

4 Tipo Racial ☐ Leucoderma ☐ Xantoderma ☐ Melanoderma ☐ Feoderma

5 Tempo de TMO em anos

6 Data do TCTH

7 Tipo de transplante ☐ Aparentado ☐ Não aparentado

8 Qual (is) os medicamentos e dosagens dos medicamentos em uso no momento?

9 Percebeu alguma alteração na sua boca nos últimos meses? Sim ☐ Não ☐
Qual? _____

10 Faz bochecho com alguma substância? Sim ☐ Não ☐ Qual? _____

11 Você é fumante? Sim ☐ Não ☐

12 Consome álcool diariamente? Sim ☐ Não ☐

13 Já apresentou neoplasia? Sim ☐ Não ☐ Local: _____

APÊNDICE 5

Ficha de análise citológica

Código:

Maturação Celular

☐ Camada superficial anucleada

☐ Camada superficial nucleada

☐ Camada Intermediária

☐ Camada basal

Classificação de Papanicolaou

☐ Classe 0

☐ Classe I

☐ Classe II

☐ Classe III

☐ Classe IV

☐ Classe V

Alterações Celulares

Núcleo	Citoplasma
<input type="checkbox"/> Hiperchromatismo	<input type="checkbox"/> Propriedades alteradas dos corantes
<input type="checkbox"/> Figuras aberrantes de mitose	<input type="checkbox"/> Vacuolização
<input type="checkbox"/> Aumento exagerado do núcleo	<input type="checkbox"/> Inclusão
<input type="checkbox"/> Anormalidades na cromatina	<input type="checkbox"/> Anisocitose
<input type="checkbox"/> Multinucleação	<input type="checkbox"/> Polimorfismo
<input type="checkbox"/> Anisocariose	

ANEXO 1



Curitiba, 19 de novembro de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Anna Clara Duszczak D'Agulham
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE CITOLÓGICA E QUANTITATIVA DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES DA MUCOSA BUCAL DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA DE FANCONI", foi analisado COM PENDÊNCIA pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 26 de outubro de 2010. Após, analisada as respostas das pendências encaminhadas pela pesquisadora, este CEP/HC considera o projeto aprovado em 19 de novembro de 2010. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0282.0.208.000-10
Registro CEP: 2344.238/2010-10

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 19 de maio de 2011.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Renato Tambara Filho'.

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2

SOLUÇÃO	TEMPO/PROCEDIMENTO
Álcool etílico 80%	10-15 mergulhadas
Álcool etílico 70%	10-15 mergulhadas
Álcool etílico 50%	10-15 mergulhadas
Água Destilada	10-15 mergulhadas
Hematoxilina de Harris	1 minutos
Água corrente	2 minutos
HCl 0,5% em água destilada	2 mergulhadas
Álcool etílico 50%	10 – 15 mergulhadas
Álcool etílico 70%	10 – 15 mergulhadas
Álcool etílico 80%	10 – 15 mergulhadas
Álcool absoluto	10 – 15 mergulhadas
Orange G 6	1 mergulhada
Álcool absoluto	10 – 15 mergulhadas
Álcool absoluto	10 – 15 mergulhadas
Álcool absoluto	10 – 15 mergulhadas
EA-36	1 minuto
Álcool absoluto	10 mergulhadas
Álcool absoluto	10 mergulhadas
Álcool absoluto	10 mergulhadas
Álcool absoluto	10 mergulhadas
50/50 Xilol e Álcool	10-15 mergulhadas
Xilol	10-15 mergulhadas
Xilol	10-15 mergulhadas
Xilol	10-15 mergulhadas
Xilol	10-15 mergulhadas
Montagem da Lâmina	

FONTE: DIGENE do Brasil, (2002)

ANEXO 3

SOLUÇÃO A: 2g de gelatina (sem sabor) dissolvida em 100 ml de água destilada pré aquecida. Adicionar 1g de ácido fórmico.

SOLUÇÃO B: nitrato de prata a 50% (50 gramas de nitrato de prata e 100 ml de água destilada)

Misturar 1 volume de solução A com 2 volumes da solução B.

- 1- colocar no recipiente com as lâmina ,deixando sobre 30minutos, no escuro e a temperatura ambiente;
- 2- Lavar em água destilada;
- 3- Colocar em metabissulfito de sódio a 1% (1 grama em 100 ml de água destilada) de 1 à 3 minutos – ideal de 2 minutos
- 4- Lavar em água destilada;
- 5- Colocar tiassulfato de sódio a 2% (2 gramas em 100 ml de água destilada) de 1 à 3 minutos
- 6- Lavar em água destilada
- 7- Deixar 1 minuto em álcool absoluto;
- 8- Deixar mais 1 minuto em novo álcool absoluto;
- 9- Mais um minuto em novo álcool absoluto;
- 10-Deixar 1 minuto em xilol;
- 11-Deixar mais 1 minuto em novo xilol;
- 12-Mais um minuto em novo xilol
- 13-Montagem de lâminas com bálsamo Histolam da biotec e lamínula de 24X50mm.